

THESE

présentée à l'U.E.R. de Chimie de l'Université de Nantes

par

Pierre JALLET

en vue de l'obtention du titre de
Docteur ès-Sciences Physiques

LE TRANSPORT ACTIF DES CATIONS A TRAVERS LES MEMBRANES DES ERYTHROCYTES HUMAINS

Soutenue le 20 Avril 1972 devant la Commission d'Examen

Président d'Honneur : Monsieur le Recteur Jean ROCHE
Professeur au Collège de France
Membre de l'Institut
Membre de l'Académie de médecine

Examineurs }
M. J. PIERI, *Président*
M. R. SELLIER

THESE

présentée à l'U.E.R. de Chimie de l'Université de Nantes

par

Pierre JALLET

en vue de l'obtention du titre de
Docteur ès-Sciences Physiques

LE TRANSPORT ACTIF DES CATIONS A TRAVERS LES MEMBRANES DES ERYTHROCYTES HUMAINS

Soutenue le 20 Avril 1972 devant la Commission d'Examen

Président d'Honneur : Monsieur le Recteur Jean ROCHE
Professeur au Collège de France
Membre de l'Institut
Membre de l'Académie de médecine

Examineurs

}

M. J. PIERI, *Président*
M. R. SELLIER



Monsieur le Recteur Jean ROCHE, Professeur au Collège de France, Membre de l'Institut, Membre de l'Académie de Médecine, s'est intéressé à nos travaux et nous fait le très grand honneur de présider notre jury de thèse. Qu'il nous soit permis de lui exprimer notre très respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur J. PIERI a suivi le développement de ce travail, n'a cessé de l'encourager et nous a fourni les conseils et les réflexions nécessaires pour mener à bien ces travaux. Nous tenons à lui témoigner notre sincère et profonde gratitude pour la confiance qu'il nous a toujours accordée.

Monsieur le Professeur R. SELLIER nous fait l'honneur d'accepter de faire partie de notre jury de thèse. Qu'il reçoive ici nos plus vifs remerciements.

P L A N

INTRODUCTION

CARACTERES GENERAUX DE LA POMPE A SODIUM

PREMIERE PARTIE : LE TRANSFERT DU SODIUM A TRAVERS LA MEMBRANE DES ERYTHROCYTES HUMAINS

- Données théoriques
- Matériels et méthodes
- Résultats
- Discussion

DEUXIEME PARTIE : L'ATPASE " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} DEPENDANTE"

A) Matériels et méthodes

- 1) Préparation des membranes de globules rouges humains
- 2) Technique d'étude de la cinétique de la réaction d'hydrolyse de l'ATP
- 3) Détermination de la constante d'équilibre du complexe MgATP^{2-}

B) Les effets du magnésium et du calcium sur la cinétique d'hydrolyse

- 1) Le magnésium
- 2) Le calcium

C) Etude du comportement cinétique de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante" en fonction des ions sodium et potassium

- 1) Effets des cations monovalents sur l'étape de phosphorylation de l'enzyme
- 2) Intervention du sodium et du potassium au niveau du système transporteur

TROISIEME PARTIE : SOLUBILISATION DES MEMBRANES A L'AIDE DU
DETERGENT ANIONIQUE LE "LUBROL WX"

CONCLUSION

INTRODUCTION

"Parmi les problèmes que la cellule vivante soumet à la perspicacité des biologistes, celui de la nature et la signification des différences qu'elle entretient dans sa composition ionique par rapport à celle du milieu qui l'entoure est des plus mystérieux et des plus ardues." écrivait CIER en 1961 (1).

A ne considérer que les deux cations principaux, sodium et potassium, l'intérieur de la cellule est riche en ions potassium, pauvre en ions sodium, alors que le rapport des concentrations est inverse dans le milieu extracellulaire. Ces différences sont indispensables au fonctionnement normal de l'organisme, l'excitabilité nerveuse et musculaire, les activités enzymatiques étant sous la dépendance de la composition électrolytique des cellules.

Le maintien de ce déséquilibre ionique entre les deux milieux intra- et extra-cellulaires est une des fonctions essentielles de la membrane cytoplasmique. Or, les différences de concentration pour une espèce d'ions ne peuvent être attribuées à une membrane entièrement imperméable, puisque des expériences faites avec des traceurs radioactifs ont montré le passage des électrolytes. Une telle différence ne peut donc se réaliser que grâce à un travail constant. Par ailleurs, les membranes cellu-

lares sont polarisées, le côté intérieur étant chargé négativement par rapport à la surface extérieure. Le gradient électrique pourrait ainsi, malgré le gradient de concentration opposé, faciliter l'entrée dans la cellule des ions potassium. Au contraire, les gradients chimique et électrique sont opposés au mouvement du sodium hors de la cellule.

Ainsi, pour garder son équilibre ionique, force est pour la cellule d'expulser continuellement une quantité de sodium équivalente à celle que le gradient de potentiel électrochimique y fait entrer par diffusion. Le processus actif par lequel est réalisé le mouvement des ions sodium hors de la cellule est désigné par le terme "transport actif" ou "pompe à sodium", et a été défini par USSING (2) comme un transfert d'ions contre un gradient électrochimique. Cette pompe fournit un travail et de ce fait consomme de l'énergie.

L'expulsion active du sodium hors de la cellule est couplée aux mouvements en sens inverse du potassium.

Les échanges ioniques à travers les membranes cellulaires représentent donc un système extrêmement complexe.

Un immense travail a été accompli au cours des dernières années pour comprendre les bases moléculaires du transport des ions. Nous rappellerons les caractères généraux de la pompe à sodium et les conceptions récemment proposées sur son fonctionnement, avant de présenter une analyse des réactions impliquées au cours du transport actif des cations à travers les membranes des érythrocytes humains.

CARACTERES GENERAUX DE LA POMPE A SODIUM

Nous examinerons très brièvement les caractères essentiels de la pompe à sodium, obtenus à partir d'expériences faites sur des préparations biologiques les plus diverses.

1) La pompe à sodium consomme de l'énergie

Les mouvements ioniques s'opérant contre les gradients de potentiel électrochimique nécessitent de l'énergie qui est fournie par l'ATP. C'est pourquoi les inhibiteurs de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative inhibent également la pompe à sodium.

La concentration en ATP et en phosphagène de l'axone géant du calmar peut être réduite jusqu'à épuisement par le cyanure ou le dinitrophénol. On observe alors une baisse importante de l'efflux de sodium (3). Si les inhibiteurs sont enlevés, il y a resynthèse des composés à liaison phosphatée riche en énergie, ce qui entraîne parallèlement une augmentation de la sortie du sodium.

Une élégante méthode souligne le rôle de l'ATP dans l'expulsion active du sodium hors du globule rouge (4). Si des hématies sont placées dans un milieu hypotonique, elles subissent un gonflement progressif, ce qui rend leur membrane de plus en plus perméable. Les constituants du milieu intérieur et du milieu extérieur s'échangent alors rapidement et les érythrocytes deviennent des "fantômes". Ceux-ci peuvent être rendus à nouveau étanches en les retournant dans un milieu normal. Cette méthode permet d'incorporer à l'intérieur de la cellule les constituants désirés. On s'aperçut ainsi que la pompe ne fonctionnait pas pour une concentration intra-

cellulaire en ATP nulle. Le flux actif des cations persiste au contraire, si, au cours de l'hémolyse, une certaine quantité d'ATP est maintenue dans les cellules. Les autres composés phosphatés ne sont que des médiocres remplaçants de l'ATP.

Une relation entre l'activité de la pompe et la production d'ATP a été montré par WHITTAM et AGER (5) pour les érythrocytes. Une augmentation de la production d'ATP à l'intérieur des globules rouges est trouvée lorsque le transport actif est stimulé par la présence des ions sodium à l'intérieur des cellules, ou des ions potassium dans le liquide extracellulaire. Cette technique permet aussi de montrer que la présence de magnésium dans la cellule est indispensable au fonctionnement de la pompe.

2) L'expulsion active du sodium hors des cellules est couplée avec un mouvement en sens inverse du potassium.

Dans les fantômes d'hématies reconstitués, rechargés de sodium et d'ATP, le débit de l'expulsion des ions sodium est constant lorsque la concentration extérieure est égale ou supérieure à 10mM. Au dessous de cette concentration, la sortie du sodium diminue (6). En l'absence d'ions potassium dans le liquide extracellulaire, elle tombe au tiers de sa valeur maximale, cette sortie résiduelle correspondant à un transport passif. La courbe sortie active du sodium hors des hématies en fonction de la concentration du potassium externe a une forme hyperbolique (7) et suggère que les ions potassium se combinent à un site enzymatique sur la face externe de la membrane et active de ce fait la sortie du sodium.

De même, lors de l'immersion du nerf de crabe préalablement chargé de sodium, dans de l'eau de mer artificielle, une sortie nette des ions sodium ne se produit qu'en présence d'ions potassium dans le milieu extérieur (8). Les ions potassium peuvent être remplacés par les ions thallium, rubidium et, à un moindre degré, par ceux de césium, de lithium et d'ammonium. Le sodium intracellulaire ne peut être remplacé par d'autres cations (9). Le calcium additionné au milieu intérieur inhibe fortement le transport actif du sodium. Cette inhibition peut être partiellement levée par les ions

magnésium ou par l'augmentation de la concentration du sodium.

Les résultats concernant le rapport entre les ions sodium expulsés de la cellule et les ions potassium qui y entrent en échange ne sont pas tous identiques. D'après GILL et SOLOMON (10), ce rapport serait égal à l'unité pour les globules rouges humains normaux. Le même rapport a été trouvé par TOSTESON et HOFFMAN (11) pour les érythrocytes de mouton.

Mais des recherches plus récentes ne confirment pas ces observations (12) et il semble admis aujourd'hui que la sortie de trois sodium se fasse en échange de deux ions potassium par molécule de phosphate inorganique libérée à la suite de l'hydrolyse de l'ATP.

L'inégalité quantitative des échanges ioniques, associée à la différence de perméabilité de la membrane vis à vis des deux cations entraîne globalement un transfert de charges positives de l'intérieur vers l'extérieur par rapport à une cellule où le mécanisme de transport actif est bloqué. En ce sens, on peut dire que la pompe a un effet électrogène.

3) Le transport actif est inhibé par certains glucosides cardiaques et particulièrement par l'ouabaïne.

Certains glucosides cardiaques (digitaline et surtout l'ouabaïne) sont de puissants inhibiteurs de la pompe, et il semble que cette action soit due à la position du lactone attaché au C₁₇ du glucoside (13). Cet effet inhibiteur a été observé dans tous les tissus étudiés, mais la sensibilité à ce glucoside est très variable. En général, une concentration de l'ouabaïne égale à 10^{-5} M suffit à amener une inhibition de 50% de la pompe à sodium. L'inhibition de la pompe n'a lieu que si ce glucoside est employé à la surface externe de la cellule. L'effet inhibiteur peut être considérablement réduit si la teneur du milieu extracellulaire en potassium est augmentée, ce qui suggère que le point d'action de l'ouabaïne est à l'extérieur de la membrane au niveau de la pompe.

4) Le système membraneux est asymétrique pour les effets des ions sodium et potassium.

"Le caractère peut-être le plus frappant de la membrane des cellules intactes est sa sélection pour le transport du potassium vers l'intérieur à partir d'une solution moins riche en potassium qu'en sodium et sa sélection pour la sortie du sodium à partir du milieu intracellulaire renfermant moins de sodium que de potassium. La membrane est donc asymétrique, ayant une préférence pour la sortie du sodium et l'entrée du potassium." écrivait WHITTAM (14).

L'action inhibitrice de l'ouabaïne traduit également l'asymétrie fonctionnelle de la pompe à sodium. Le glucoside n'agit que s'il est employé à la face externe de la membrane. Injectée par exemple dans l'axone géant de calmar, l'ouabaïne n'influence nullement le transport actif du sodium.

5) Il existe d'autres modes d'échanges ioniques à travers les membranes.

La sortie du sodium couplée à l'entrée du potassium ne sont pas les deux seuls flux ioniques liés au transport actif.

Des mesures d'influx et d'efflux du sodium à l'aide d'indicateurs radioactifs, sur des érythrocytes en suspension dans un milieu ne contenant pas de potassium, montre qu'un transport actif de Na^+ existe dans les deux sens. L'influx actif ainsi mis en évidence est couplé à l'efflux actif habituel, son amplitude diminuant lorsque la concentration en potassium externe augmente, ce phénomène étant supprimé aux concentrations physiologiques. En réalité, il s'agit d'un échange des ions sodium intra- et extra-cellulaires qui requiert la présence d'ATP (15). Cela suggère que l'ATP est nécessaire pour la formation d'un transporteur du sodium.

Le potassium semble également capable d'un faible échange actif entre milieu interne et milieu externe (16). Des mesures réalisées sur

des érythrocytes conservés plusieurs jours sans glucose ont permis de mettre en évidence un efflux actif de potassium lorsque dans le compartiment intracellulaire la concentration en ATP est faible tandis que celles de l'A.D.P. et du phosphate inorganique sont fortes. Cet efflux est couplé à un influx actif du sodium, et une synthèse d'ATP à l'intérieur de la cellule a pu être mise en évidence. On peut donc admettre que, dans les conditions définies ci-dessus, la pompe est capable d'assurer un fonctionnement réversible.

Une autre forme du transport du sodium, qui semble non liée à la pompe à sodium, a été décrite. En effet, SJODIN et BEAUGE (17) mirent en évidence dans le muscle de grenouille et en présence de ouabaïne un efflux de sodium, insensible au potassium externe et diminuant considérablement si le sodium externe était remplacé par du lithium. De même, dans les globules rouges en présence de glycosides cardiaques (18), efflux et influx de sodium sont fonction des concentrations intra- et extra-cellulaires en Na^+ . Ces résultats semblent montrer qu'il existe un système d'échange indépendant de la pompe, spécifique pour le sodium puisque le lithium ne peut le remplacer.

Ainsi, interviennent pour les cations Na^+ et K^+ trois mécanismes d'efficacité très inégales : le transport actif, l'échange équivalent et la diffusion passive qui existe le long des gradients électrochimiques.

6) L'adénosine triphosphatase spécifique : $\text{Mg}^{2+}\text{-Na}^+\text{-K}^+$ ATP^{ase}

L'hydrolyse de l'ATP, comme source d'énergie nécessaire au fonctionnement de la pompe à sodium, a conduit à la découverte d'une ATPase spécifique liée à la membrane cellulaire pour tous les tissus capables de réaliser le transport actif du sodium. En réalité, il existe dans les membranes deux composantes ATPasiques : l'une nécessite la présence d'ions magnésium et n'est pas inhibée par l'ouabaïne, l'autre requiert en plus du magnésium les ions sodium et potassium, est inhibée par l'ouabaïne, et également par le calcium. Tous les travaux concordent pour montrer que ce deuxième enzy-

me désigné ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" présente les mêmes caractères principaux que la pompe à sodium et est, de par ce fait, une partie intégrale du système assurant le transport actif.

7) Mécanisme d'action de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante"

De nombreux travaux ont été entrepris pour élucider le mécanisme biochimique de la pompe à sodium, et ont été centrés sur les caractères et le mode d'action de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante". Les différentes étapes qui conduisent à la production d'ADP et de phosphate inorganique sont actuellement envisagées de la façon suivante (19)(20) :

- La première étape de l'hydrolyse de l'ATP est une phosphorylation de l'enzyme. L'attachement du phosphate inorganique par une liaison riche en énergie active l'enzyme. Cette phosphorylation ne peut se faire qu'en présence de sodium au niveau de la face interne de la membrane et est stimulée par ce cation. La déphosphorylation est activée par les ions potassium et s'effectue à la face externe.

- Une réaction d'échange entre l'ADP et l'ATP, sous la dépendance de la $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$ -ATPase, a été mise en évidence.

- Un ou plusieurs états de l'enzyme phosphorylé ont été décrits ; ils correspondraient aux différentes phases du transfert des ions à travers la membrane. L'identification du ou des intermédiaires phosphatés a fait l'objet de très nombreuses études, car la nature de ce composé devrait permettre la compréhension du mécanisme biochimique de la pompe. Après incubation avec l'ATP³² d'une préparation ATPasique provenant des fragments membranaires du tissu rénal, POST, SEN et ROSENTHAL (21) notèrent la formation d'une protéine radioactive précipitable par l'acide trichloracétique. Cette protéine se formait seulement en présence des ions sodium, elle était déphosphorylée par les ions potassium. L'ouabaine inhibait sa production. Il semble que l'intermédiaire phosphaté soit le L-glutamyl- -phosphate(22). Pour d'autres auteurs (23) le phosphate se combinerait sous forme d'un acylphosphate, mais personne n'a isolé et caractérisé les molécules en cause.

8) Modèles de la pompe à sodium

L'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" dont l'activité est étroitement liée au transport actif des cations Na^+ , K^+ , est en réalité un système enzymatique complexe à plusieurs composantes fonctionnelles. Il était nécessaire de faire entrer tous ces éléments dans une représentation fonctionnelle cohérente et de nombreux modèles hypothétiques ont été proposés.

Nous ne décrirons pas ces modèles (24)(25), mais la plupart s'appuie sur l'une ou l'autre des deux hypothèses suivantes :

a) Une macromolécule lipoprotéique possédant une activité ATPasique serait couplée à un grand nombre de petites molécules transporteuses. Ces molécules, lors de l'hydrolyse de l'ATP, sont phosphorylées et ce sont elles qui vont assurer le va et vient des cations.

b) Cette macromolécule représenterait à elle seule le système transporteur. Le contact avec le sodium ou le potassium amènerait un changement de configuration avec rotation de telle sorte qu'un site en contact initialement avec le milieu intracellulaire peut être amené en contact avec le milieu extracellulaire.

Les modèles qui en découlent sont tous plus ou moins éloignés de la réalité, et leur seule valeur pour l'instant est de fournir une infrastructure sur laquelle baser des expériences qui pourraient conduire à une connaissance plus approfondie.

Pour analyser les réactions impliquées au cours du fonctionnement de la pompe à sodium, nous avons étudié sur les membranes des érythrocytes humains les points suivants :

1) Le transfert du sodium

Des mesures d'influx et d'efflux du Na^{22} mettent en évidence une cinétique caractéristique d'un système à trois compartiments qui peut être reliée à la formation d'un complexe entre le sodium et une molécule "transporteuse" de la membrane.

2) La vitesse d'hydrolyse de l'ATP en fonction des concentrations en Mg^{2+} , Ca^{2+} , Na^{+} et K^{+} .

Les résultats obtenus quant aux effets du magnésium et du calcium nous permettent de préciser le mode d'action de ces ions au niveau de la phosphorylation de l'enzyme, puis sur l'enzyme phosphorylé.

Les modifications des paramètres cinétiques de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante", étudiées en fonction des concentrations en sodium et potassium, permettent d'analyser l'intervention de ces cations aux différents niveaux de la réaction d'hydrolyse de l'ATP. Les interactions ions-sites transporteurs sont envisagées et un schéma réactionnel qui ne tient pas compte de la nature du transporteur est proposé.

3) La solubilisation de ces membranes à l'aide d'un détergent non ionique "le Lubrol wx".

Une activité " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante" partiellement purifiée est retrouvée dans la préparation solubilisée. Le "Lubrol" qui, aux concentrations employées ne perturbe pas le système luciférine-luciférase utilisé pour la mesure de l'activité ATPasique, permet d'étudier l'activité enzymatique de la solution obtenue dans les mêmes conditions que pour les membranes intactes.

PREMIERE PARTIE

LE TRANSFERT DU SODIUM A TRAVERS LA
MEMBRANE DES ERYTHROCYTES HUMAINS

Les indicateurs nucléaires ont été largement utilisés dans l'étude des flux du sodium et du potassium à travers les membranes. Cependant, la plupart des travaux n'utilisent que des mesures "statistiques" où le flux de chacun de ces cations sont mesurés à un instant donné dans des conditions physiologiques et non physiologiques.

Une autre méthode est de considérer des globules rouges en équilibre avec leur milieu extérieur quant à la concentration en Na^+ ou K^+ , et d'utiliser un traceur radioactif, qui, lui, ne soit pas en équilibre au début de l'expérience. On peut faire alors une étude "dynamique" du retour à l'équilibre de cet isotope. La cinétique de la réaction permet d'obtenir des renseignements non seulement sur les phénomènes de diffusion, mais aussi sur les interactions entre le cation étudié et le "transporteur".

SOLOMON, utilisant cette technique lors d'une étude du transfert du sodium et du potassium à travers les membranes de globules rouges, obtint des résultats différents pour chacun des deux cations envisagés (26). En effet, la cinétique trouvée par cet auteur pour le transfert du potassium peut être décrite par une équation qui est la somme de deux exponentielles ; celle relative au transfert du sodium correspond à l'équation d'une seule exponentielle. Cette disparité est surprenante car les flux actifs des deux cations sont couplés, et le même mécanisme de transport doit intervenir pour les deux ions.

De plus, sans vouloir préjuger de la nature du transporteur, l'existence généralement admise d'une liaison ion-site transporteur implique, comme nous le montrons ci-dessous, une cinétique décrite par la somme de deux exponentielles.

DONNEES THEORIQUES

Les équations se rapportant à la cinétique du transfert du sodium à travers la membrane doivent tenir compte, d'une part de la diffusion passive qui se fait le long du gradient de potentiel électrochimique existant entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, d'autre part du transport actif.

Le flux par unité de surface de membrane d'un globule rouge, dû au transport passif est donné par :

$$I \quad M = -Kc \frac{d\mu}{dx}$$

où : $\mu = \mu_0 + RT \log c + ZF\psi$ est le potentiel électrochimique local

μ_0 = potentiel électrochimique standard

c = concentration locale de la molécule diffusant

ψ = potentiel électrique local

γ = constante d'affinité

Pour résoudre l'équation I, nous supposons le champ électrique constant dans la membrane. Cette hypothèse a été souvent employée (27), depuis les travaux de GOLDMAN(28). Il vient :

$$(1-1) \quad \psi = - \frac{E \cdot x}{x_0} \quad \text{où :}$$

E = différence de potentiel de membrane

x varie de 0 à x_0 de la face externe à la face interne de la membrane.

L'équation I s'écrit :

$$(2-1) \quad M = -KRTc \frac{d(\log c \cdot e^{\frac{ZF\psi}{RT}})}{dx}$$

Les équations (1-1) et (2-1) conduisent à :

$$(3-1) \quad M = KRT \left(\frac{ZF}{RT} \cdot \frac{E}{x_0} C - \frac{dc}{dx} \right)$$

En intégrant de 0 à x_0 , on obtient :

$$(4-1) \quad M = \frac{KZFE}{x_0} \left(\frac{C_e - C_i e^{-\frac{ZFE}{RT}}}{1 - e^{-\frac{ZFE}{RT}}} \right)$$

avec : C_e = concentration externe

C_i = concentration interne

Soit :

$$II \quad M = K_1(Na_e) - K_2(Na_i)$$

où K_1 et K_2 sont les constantes de transfert

(Na_e) concentration du sodium extérieur

(Na_i) concentration du sodium intérieur du globule rouge.

L'équation II avait déjà été introduite par HARRIS et BURN (29) qui supposaient la probabilité de transfert d'un ion, d'un compartiment vers l'autre, proportionnelle à sa concentration.

Pour un érythrocyte, le flux sera donné par :

$$III \quad M_T = M.S = K_1S(Na_e) - K_2S(Na_i)$$

avec S : surface du globule rouge.

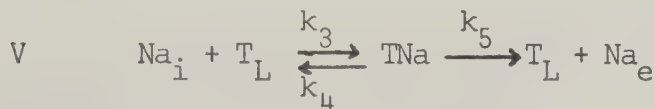
La variation de concentration du sodium intra-globulaire par diffusion est alors :

$$IV \quad \left| \frac{d(Na_i)}{dt} \right|_{diff} = k_1(Na_e) - k_2(Na_i)$$

avec : $k_1 = \frac{K_1 S}{v}$ $k_2 = \frac{K_2 S}{v}$

où v est le volume de l'érythrocyte.

Ecrivons les équations se rapportant au transport actif. Celui-ci aboutit à la formation d'un complexe transporteur-sodium dans la membrane. Nous ferons l'hypothèse que tout se passe selon la réaction :



où T_L = système transporteur non lié

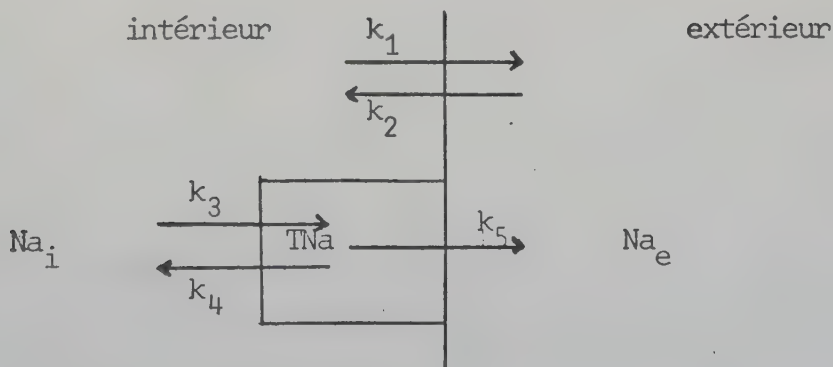
TNa = complexe formé entre ce système et le sodium intraglobulaire.

L'étude cinétique d'une telle réaction permet d'obtenir les équations différentielles VI et VII qui relient les variables (T_L) , (Na_i) , (TNa) .

$$VI \quad \left| \frac{d(Na_i)}{dt} \right|_{\text{transport}} = -k_3(T_L)(Na_i) + k_4(TNa)$$

$$VII \quad \frac{d(TNa)}{dt} = k_3(T_L)(Na_i) - (k_4 + k_5)(TNa)$$

Ainsi, le transfert du sodium à travers la membrane peut être représenté par le schéma ci-dessous, qui est régi par les équations différentielles IV, VI, VII.



Le modèle proposé ne tient pas compte de la possibilité d'un échange entre

le sodium libre dans la membrane et le sodium lié. Une telle éventualité est peu probable car il semble que le transporteur ne puisse migrer à travers la membrane que s'il est lié à un cation (15).

Résoudre un tel système d'équations différentielles est aisé lorsque les coefficients ne varient pas en fonction du temps. Or, ce cas particulier est réalisé expérimentalement si l'on se place dans les conditions où le sodium intraglobulaire reste constant, ce qui suppose les érythrocytes en équilibre avec leur milieu extérieur.

Ces conditions étant supposées réalisées, considérons maintenant un traceur radioactif qui lui ne soit pas en équilibre au début de l'expérience. Les équations IV, VI, VII peuvent alors s'appliquer à la cinétique du sodium radioactif Na^* .

Pour avoir des conditions limites facilement utilisables, on se placera au temps zéro dans l'un des deux cas suivants :

- Le Na^* est uniquement à l'intérieur des globules rouges et on étudie l'efflux de l'isotope vers le milieu extérieur.

- Le Na^* est uniquement à l'extérieur des globules rouges et on étudie l'influx de l'isotope vers le milieu intérieur.

a) Résolution du système d'équations différentielles lors de l'efflux.

La variation globale de la concentration du sodium radioactif intraglobulaire doit tenir compte de deux composantes :

$$\text{VIII} \quad \frac{d(\text{Na}_i^*)}{dt} = \left| \frac{d(\text{Na}_i^*)}{dt} \right|_{\text{diff.}} + \left| \frac{d(\text{Na}_i^*)}{dt} \right|_{\text{transport}}$$

soit :

$$\text{IX} \quad \frac{d(\text{Na}_i^*)}{dt} = k_1(\text{Na}_e^*) - k_2(\text{Na}_i^*) = k_3(\text{Na}_i^*)(T_L) + k_4(T\text{Na}^*)$$

avec :

$$\text{VII} \quad \frac{d(T\text{Na}^*)}{dt} = k_3(T_1)(\text{Na}_i^*) - (k_4 + k_5)(T\text{Na}^*)$$

Si on convient d'écrire $(Na_1^*)=x$, $(TNa^*)=y$, on peut exprimer à chaque instant (Na_e^*) en fonction de x et y . En effet, au temps zéro :

$$x=x_0 \quad y=y_0 \quad (Na_e^*) = 0.$$

On a de plus la relation :

$$(2-1) \quad (Na_e^*) = |(x_0 + y_0) - (x + y)| \frac{V}{V}$$

avec : V = volume du milieu extérieur

v = volume du système globulaire

Les équations VII et IX peuvent s'écrire en fonction de x et y :

$$(2-2) \quad \frac{dx}{dt} = -ax + b(x_0 + y_0) + cy$$

$$(2-3) \quad \frac{dy}{dt} = -ey + fx$$

$$\text{avec} \quad a = \frac{k_1 v}{V} + k_2 + k_3 (T_L)$$

$$b = \frac{k_1 v}{V}$$

$$c = (k_4 - k_1 \frac{v}{V})$$

$$e = k_4 + k_5$$

$$f = k_3 (T_L)$$

Les quantités a et f sont des constantes car (T_L) ne varie pas en fonction du temps. En effet, les globules rouges sont supposés en équilibre avec leur milieu extérieur, et par conséquent, les concentrations intraglobulaires totales (Na_1) et (TNa) sont constantes.

Les équations (2-2) et (2-3) conduisent aux équations différentielles suivantes :

$$(2-4) \quad \frac{1}{c} \frac{d^2 x}{dt^2} + \frac{dx}{dt} \left(\frac{a+e}{c} \right) + x \left(\frac{ae}{c} - f \right) = \frac{be}{c} (x_0 + y_0)$$

.../...

$$(2-5) \quad \frac{1}{f} \frac{d^2 y}{dt^2} + \frac{dy}{dt} \left(\frac{a+e}{f} \right) + y \left(\frac{ae}{f} - c \right) = b(x_0 + y_0)$$

La solution de l'équation (2-4) s'écrit :

$$(2-6) \quad x = A_1 e^{-\alpha t} + B_1 e^{-\beta t} + \lambda_1 (x_0 + y_0)$$

$$\text{avec : } \lambda_1 = \frac{Le/c}{\frac{ae}{c} - f}$$

α et β sont des valeurs réelles car quels que soient les coefficients le discriminant Δ est toujours positif.

De même, la solution de l'équation (2-5) s'écrit :

$$(2-7) \quad y = A_2 e^{-\alpha t} + B_2 e^{-\beta t} + \lambda_2 (x_0 + y_0)$$

$$\text{avec : } \lambda_2 = \frac{b}{\frac{ae}{f} - c}$$

L'équation correspondant à la variation de concentration du sodium radioactif intraglobulaire total (c'est-à-dire libre et lié), soit $X = x + y$, est donné par :

$$(2-8) \quad X = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t} + C$$

$$\text{avec : } \alpha = \frac{-(a+e) - \sqrt{(a-e)^2 + 4fc}}{2}$$

$$\beta = \frac{-(a+e) + \sqrt{(a-e)^2 + 4fc}}{2}$$

Les termes A et B sont obtenus en écrivant X et $\frac{dX}{dt}$ au temps zéro.

b) Résolution du système d'équations différentielles lors de l'influx

Au temps zéro, la concentration du sodium radioactif dans le milieu extracellulaire est noté (Na_o^*) . L'expression de (Na_e^*) en fonction de x et y devient :

$$\text{XI} \quad \frac{v}{V} (\text{Na}_e^x) = (\text{Na}_o^x) - (x + y)$$

Si on porte (Na_e^x) dans les équations VII et IX, on retrouve les mêmes résultats que ceux d'efflux, en remplaçant b par k_1 et $(x_o + y_o)$ par (Na_o^x) soit :

$$\text{XII} \quad X = -A' e^{-\alpha t} - B' e^{-\beta t} + C'$$

Ainsi la cinétique du transfert du sodium à travers la membrane peut être décrite par un somme de deux exponentielles si l'on fait intervenir pour le transport actif la formation d'un complexe sodium-transporteur.

MATERIEL ET METHODE

Les expériences sont réalisées à partir de sang frais recueilli sur héparine. Après centrifugation de 15 minutes à 1500 g, le plasma et les globules blancs sont éliminés par aspiration. Les globules rouges sont alors lavés trois fois avec une solution isotonique S dont la composition est la suivante :

NaCl = 136 mM	NaH ₂ PO ₄ = 2,5 mM
KCl = 4,3 mM	NaHCO ₃ = 11 mM
MgCl ₂ = 1 mM	glucose = 2 g/l
CaCl ₂ = 2,2 mM	albumine = 1 g/l

Expérience d'influx

Un volume v d'érythrocytes est mis en suspension dans un volume V de la solution S de telle sorte que l'hématocrite soit de 0,2. L'ensemble est agité dans un bain marie à 37°C pendant 45 minutes. A cet instant, comme nous le verrons plus loin, les globules rouges peuvent être considérés en équilibre avec le milieu extérieur. 20 μCi de Na^{22} sont alors ajoutés sous forme de soluté isotonique de NaCl, sous un volume d'environ $\frac{v}{100}$, ce qui ne modifie pas les concentrations, donc le potentiel de membrane des globules rouges.

Des prises de 10 ml sont effectuées à des intervalles de temps régulier pendant une durée de 8 à 10 heures. Les globules rouges sont lavés trois fois par centrifugation et remis en suspension dans 8ml de solution S dont la température est maintenue à 6°C. Les centrifugations sont effectuées à 6°C dans les conditions suivantes : 5 minutes à 1500g les trois premières fois, 30 minutes à 4100g la dernière fois. Des mesures faites sur les surnageants permettent de vérifier que ces lavages n'entraînent pas une diminution de la radioactivité des globules.

Expérience d'efflux

Les érythrocytes sont préincubés à 37°C pendant quatre heures en présence de 30 μ Ci de Na²².

L'ensemble est ensuite centrifugé pendant 15 minutes à 1500g et les érythrocytes sont lavés quatre fois.

Les globules rouges sont alors remis en suspension dans un volume V de la solution S non radioactive, maintenue depuis 20 minutes à 37°C, l'hématocrite étant toujours de 0,2.

Le protocole expérimental est ensuite le même que pour l'influx mais les érythrocytes ne sont lavés que deux fois.

Détermination puis vérification des conditions d'équilibre

Nous avons vu lors des données théoriques qu'il était nécessaire que les érythrocytes soient en équilibre avec leur milieu extérieur pendant toute la durée de l'expérience pour aboutir aux équations X et XII. Cette condition est vérifiée lorsque la concentration du sodium intraglobulaire total reste constante.

Lorsqu'elle est additionnée à des globules rouges de sang frais, la solution isotonique S permet d'obtenir un pH constant (7,45) au bout de 40 minutes, et à partir de cet instant la concentration du sodium intraglobulaire total ne varie pratiquement plus.

La détermination de cette concentration est réalisée sur chacune

des prises effectuées pendant les expériences d'influx et d'efflux à l'aide d'un spectrophotomètre à absorption atomique BECKMAN, selon le protocole suivant.

Après mesure de la radioactivité du culot globulaire, la solution S qui le recouvre est éliminée en lavant deux fois avec une solution isotonique de glucose que l'on fait couler goutte à goutte le long de la paroi du tube pour ne pas remettre en suspension la couche globulaire superficielle.

On vérifie que la radioactivité du culot globulaire n'a pas changé et on en déduit que les lavages au glucose n'ont pas modifié la teneur en sodium de celui-ci. Les érythrocytes sont alors hémolysés et les mesures spectrophotométriques sont effectuées. La précision sur le contenu en sodium des érythrocytes est de 2%.

La concentration intraglobulaire est alors calculée en tenant compte du fait qu'il existe un volume interglobulaire occupé par de la solution S contenant elle aussi du sodium.

Ce volume interglobulaire ω est évalué par des mesures conduites à 4°C avec du Na^{22} ou de la sérum-albumine marquée à l'iode 131.

La formule utilisée est alors :

$$(\text{Na}_i)_{\text{vraie}} = \frac{(\text{Na}_i)_{\text{mesurée}} - \frac{\omega}{100} (\text{Na}_e)}{1 - \frac{\omega}{100}}$$

La valeur de ω obtenue par les deux méthodes citées précédemment est de $(2,78 \pm 0,04) \%$ de celle du volume du culot globulaire.

Mesures de l'activité du Na^{22}

L'activité du culot globulaire ou des surnageants est mesurée dans un cristal puits dont les impulsions sont analysées par un spectroscope 100 canaux Laben.

Résultats

Une série d'expériences a été effectuée chez des sujets normaux. Le flux de Na^{22} est étudié pendant une durée d'environ 8 heures.

Lors des efflux, les mesures sont effectuées sur le culot globulaire et sur le surnageant.

L'activité des érythrocytes est exprimée en pourcentage de l'activité initiale ; celle des surnageants est exprimée en pourcentage de l'activité à l'équilibre et sert à contrôler les valeurs obtenues sur le culot globulaire.

Tableau 1 : efflux du Na^{22} hors des érythrocytes humains à l'équilibre

Temps	(Na_i)	$100 N_t/N_o$	$100 S_t/S_\infty$
0.....	7,9	100	0
57 min.....	8,1	68,3	32
1 h.58 min....	6,1	48,1	52
3 h.....	6,2	34,5	66
4 h. 30 min...	6,1	23,5	77
6 h.....	6,5	16,5	84
7 h.34 min....	6,7	12,6	88
8 h.37 min....	6,1	9,3	91

(Na_i) = concentration intraglobulaire en sodium donnée en milli-équivalents/litre de cellules

N_t = activité du culot globulaire au temps t

N_o = activité du culot globulaire au temps o

S_t = activité du surnageant au temps t

S_∞ = activité du surnageant à l'équilibre

Les mesures relatives aux expériences d'influx sont effectuées sur le culot globulaire et l'activité des érythrocytes est exprimée en pourcentage de l'activité à l'équilibre.

Tableau 2 : résultats obtenus lors d'une expérience d'influx
du Na²² dans les érythrocytes humains

Temps	(Na _i)	100 N _t /N _∞
15 min.....	9	12,3
49 min.....	8,5	31,4
1 h. 45 min.....	7,9	53,4
2 h. 45 min.....	8,4	68,5
3 h. 45 min.....	7,9	76,5
4 h. 45 min.....	8,1	81,4
6 h.....	8,4	85,5

N_∞ = activité du culot globulaire à l'équilibre.

Les deux expériences citées ci-dessus sont représentées sur la figure 1 et 2. Les équations correspondant aux courbes tracées ont été établies à l'aide d'un calculateur analogique, et sont données par :

$$\text{XIII} \quad 100 \frac{N_t}{N_0} = 34 e^{-0,89t} + 65 e^{-0,24t} + 1$$

$$\text{XIV} \quad 100 \frac{N_t}{N_\infty} = 100 - 48 e^{-0,90t} - 52 e^{-0,22t}$$

Elles sont donc de la forme $y = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t} + C$ et correspondent bien aux données théoriques.

Les valeurs moyennes des coefficients α et β obtenues lors de plusieurs expériences sont :

- Influx	: moyenne	$\bar{\alpha} = 1,04$	$\bar{\beta} = 0,21$
	écart type	$\sigma = 0,2$	$\sigma = 0,03$
- Efflux	: moyenne	$\bar{\alpha} = 0,98$	$\bar{\beta} = 0,19$
	écart type	$\sigma = 0,05$	$\sigma = 0,08$

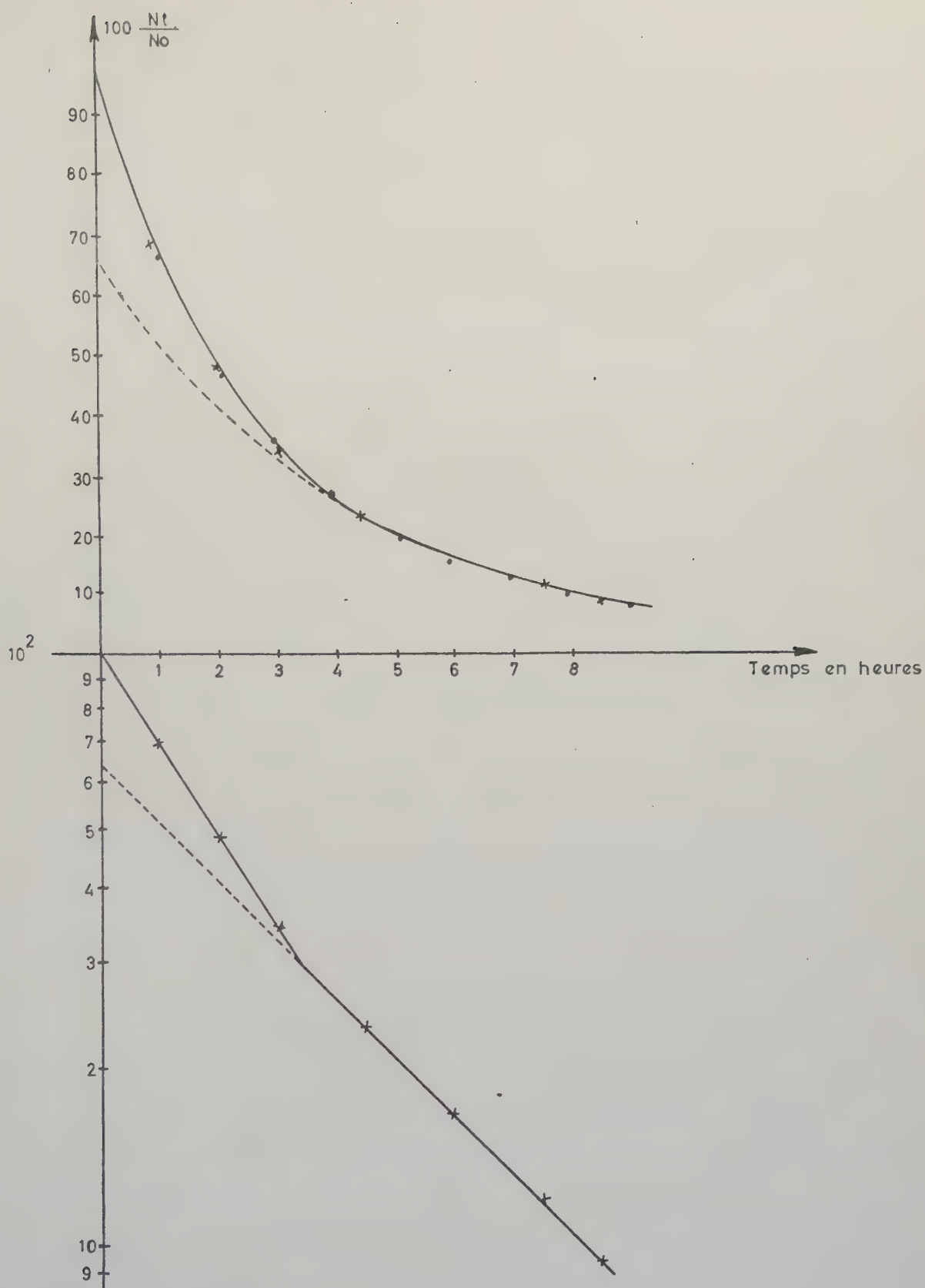


Fig.1 - Efflux du Na^{22} hors des érythrocytes humains

x : points expérimentaux

o : points théoriques correspondant à $y = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} + C$

Les pointillés représentent la courbe théorique donnée par $Be^{-\beta t} + C$

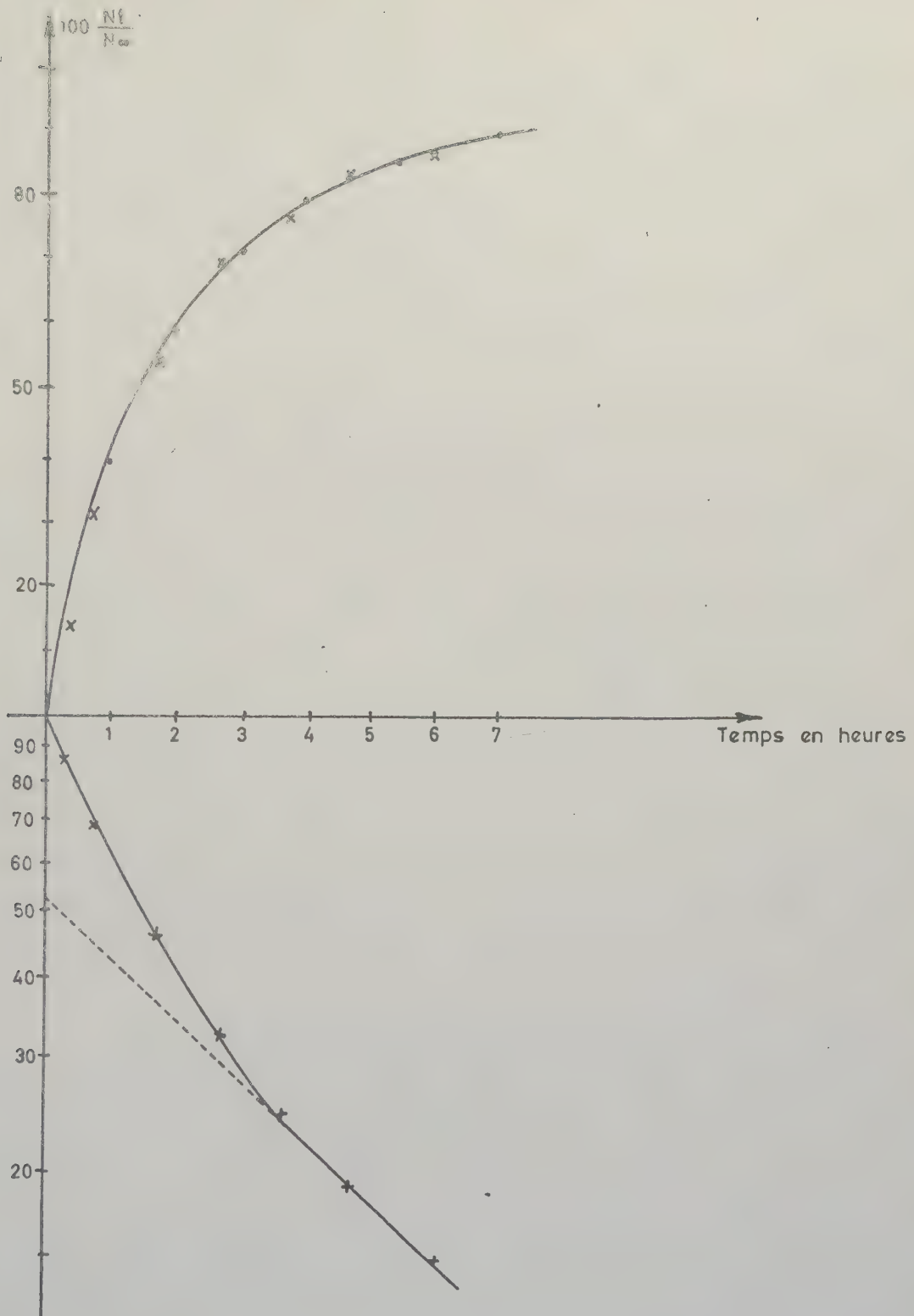


Fig.2-Influx du Na^{22} dans les érythrocytes humains.

x : points expérimentaux.

• : points théoriques correspondant à $y = C - Ae^{-\alpha t} - Be^{-\rho t}$

L'importance de l'écart type semble d  tre non seulement aux variations propres à chaque sujet, mais aussi à l'extrême sensibilité du transfert du sodium aux petites perturbations du milieu environnant.

DISCUSSION

L'existence d'une somme de deux exponentielles ne peut être interprétée en fonction des données théoriques que si les coefficients k_i sont demeurés constants. D'après les figures 1 et 2, la première exponentielle n'est mise en évidence que durant les premières heures de la manipulation. Or, dans certaines expériences, la teneur intraglobulaire en sodium est légèrement plus élevée lors des premières mesures, mais dès l'instant t où elle devient constante (1 h. 58 min. dans le tableau 1), la différence entre la valeur de la courbe expérimentale à cet instant et la valeur calculée à partir de l'équation $B e^{-\beta t} + C$ est supérieure à la somme des erreurs absolues sur chacun des points. De plus, la partie initiale de la courbe vérifie en général l'équation définie sur la portion correspondant à une concentration intraglobulaire constante, ce qui nous permet alors de penser que les coefficients k_i sont fixes dès l'instant zéro.

Les   quations X et XII sont caractéristiques de la cinétique d'un transfert dans un système à trois compartiments. Tout se passe donc comme si le transport actif se comportait comme un troisième compartiment virtuel s'ajoutant au cytoplasme et au milieu extérieur.

La plupart des travaux n'ont mis en évidence que deux compartiments pour le sodium (30) alors qu'un système à trois compartiments est généralement admis pour définir le transfert du potassium (26). Plus récemment, SHA'AFI (31) obtient aussi, sur des globules rouges de chat, une cinétique de transfert du sodium correspondant à une somme de deux exponentielles. Comme le signale SOLOMON (32)(33)    propos d'expériences réalisées in vitro, puis in vivo, deux éventualités peuvent être discutées :

- Hétérogénéité de la population des érythrocytes (double population)
- Existence d'un compartiment lentement échangeable.

S'il existe une influence de l'hétérogénéité des globules rouges sur la cinétique des cations, celle-ci doit être aussi invoquée pour le potassium, et l'utilisation des inhibiteurs ne devrait pas modifier l'importance relative des deux populations.

Or, d'après les travaux de SHA'AFI, l'étude du transfert du potassium en présence de ouabaine montre non seulement une modification des pentes α et β , mais également une modification du rapport A/B (31). Ces résultats semblent donc écarter une telle éventualité.

Ainsi, les mesures d'influx et d'efflux du Na^{22} à travers les membranes des érythrocytes humains mettent en évidence une cinétique qui semble correspondre à celle déjà trouvée pour le potassium. Les équations vérifiant cette cinétique sont caractéristiques d'un système à trois compartiments et peuvent être obtenues à partir d'un modèle de transport actif qui fait intervenir la formation d'un complexe sodium-transporteur.

.../...

DEUXIEME PARTIE

L'ATPASE " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} DEPENDANTE"

Une méthode d'analyse des interactions entre les cations monovalents et les sites transporteurs, plus précise et plus riche de renseignements que celle des flux, est l'étude de l'effet de ces ions sur le comportement cinétique de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante". En effet, quelque soit le modèle de pompe à sodium envisagé, cette enzyme est couplée au système transporteur et les interactions des ions avec celui-ci vont moduler l'activité ATPasique.

De nombreux travaux ont été réalisés sur la cinétique de la réaction d'hydrolyse de l'ATP (34)(35), et certains d'entre eux proposent que l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" soit une enzyme allostérique. Cependant, les résultats présentés dans les pages qui suivent montrent que dans les conditions où nous travaillons, son comportement en fonction de la concentration en substrat est michaelien. Les effets des cations sur l'enzyme seront donc étudiés en suivant les modifications des paramètres, vitesse maximum apparente et constante de Michaelis apparente.

Mais, avant de considérer les effets du sodium et du potassium sur le système, il nous a paru logique d'analyser l'action du magnésium et du calcium, car ce premier cation est indispensable à l'étape de phosphorylation de l'enzyme, et une compétition entre les deux ions bivalents a été décrite (36).

A) MATERIELS ET METHODES

1) Préparation des membranes de globules rouges humains

Les premières méthodes utilisées pour préparer des membranes de globules rouges ou "ghosts" font intervenir une série d'hémolyses brutales à l'aide d'eau distillée ou d'une solution tampon de faible force ionique (37). Cette technique, traumatisante pour les structures membranaires nous ayant donné des résultats peu reproductibles quant à l'activité enzymatique de la préparation, nous avons utilisé le procédé suivant d'hémolyse progressive.

- Les membranes sont préparées à partir de sang frais recueilli sur héparine depuis moins de 12 heures (500 u/cm^3). Les érythrocytes sont lavés deux fois avec du NaCl isotonique et les globules blancs qui forment une pellicule au dessus du culot sont éliminés par aspiration. L'ensemble des opérations est alors réalisé à 4°C .

- Le culot obtenu est mis en suspension pendant vingt minutes dans une solution légèrement hypotonique de pH 8 dont la composition est la suivante :

Tris 4mM/l - Cystéine 2 mM/l - NaCl 110 mM/l.

Dans ces conditions, les globules rouges gonflent, mais ne sont pas hémolysés.

- La suspension globulaire est introduite dans une cellule de filtration DIAFLO, dont la membrane située à la base est une ACROPOR AN 1200 dont le diamètre des pores est de $1,2\mu$. Une agitation magnétique maintient les érythrocytes en solution. Une solution hypotonique (Tris 4mM/l-Cystéine 2mM/l-pH8) est envoyée sous une pression d'azote comprise entre 0 et 0,2 atmosphère. Dans ce milieu, dont la force ionique diminue régulièrement, les érythrocytes gonflent, éclatent, libèrent une partie de leur contenu et se referment lorsque l'équilibre des pressions

osmotiques est rétabli. Puis, ces processus vont se répéter et l'hémoglobine progressivement libérée est entraînée à travers le filtre. Le débit de liquide est réglé à environ 400 cc/heure, et la filtration est arrêtée lorsque l'éluat est devenu incolore ce qui correspond en général à des membranes libres d'hémoglobine (1 pour cent).

- Le pH du milieu est ajusté à 7,5 et les membranes récupérées par centrifugation à 30000 g pendant 30' sont congelées brutalement à -80°C dans un mélange acétone-neige carbonique, puis conservées à -20°C.

Ce procédé permet d'obtenir des fragments de membranes ayant conservé leur activité enzymatique, donc l'intégrité du système transporteur.

2) Technique d'étude de la cinétique de la réaction d'hydrolyse de l'ATP

L'activité ATPasique des membranes en suspension dans un milieu réactionnel est évaluée par mesure de la variation de concentration en ATP, en fonction du temps, à l'aide du système enzymatique "luciférine-luciférase". Pour effectuer une analyse cinétique, il est nécessaire de travailler à des concentrations en substrat (0-24 $\mu\text{M/l}$) voisines de la valeur des constantes de Michaelis des deux ATPases étudiées. Dans ces conditions, le système "luciférine-luciférase" permet une détermination rapide et précise des différentes vitesses initiales d'hydrolyse. Celui-ci transforme l'énergie chimique de l'ATP en énergie lumineuse et la cinétique de la réaction est d'allure michaelienne. On peut donc relier la concentration en ATP à la quantité de lumière émise par unité de temps (38). L'erreur relative maximum faite sur la mesure d'une concentration en ATP est de 3% et la sensibilité de la méthode permet de mesurer des concentrations inférieures à 0,01 $\mu\text{M/l}$.

a) Préparation du système luciférine-luciférase et dosage de
l'ATP

Des abdomens de vers lumineux lyophilisés (SIGMA Chemical Company) sont broyés avec du sable et le couple enzyme-substrat est extrait par un tampon phosphate 0,15 M - pH 7,6.

La concentration en ATP d'un échantillon est déterminée selon le protocole suivant :

- 0,25 ml de la solution contenant de l'ATP est diluée dans 2ml de tampon (glycyl-glycine : 0,05 M/l - SO_4Mg : 0,1 M/l - pH : 7,5 - $T^\circ = 4^\circ\text{C}$).

- 0,1 ml de la préparation contenant le système luciférine-luciférase est injecté rapidement à l'aide d'une micropipette BECKMAN. Le mélange est agité pendant 0,1 min., puis descendu devant un photomultiplicateur (compteur à scintillation liquide NUCLEAR CHICAGO Unilux II). Le nombre N de photons reçu par le photomultiplicateur est compté pendant 0,4 min. Le système est étalonné à l'aide de différentes dilutions d'une solution étalon en ATP.

b) Mesure de la vitesse initiale des ATPases des membranes

L'existence de deux ATPases " Mg^{2+} dépendante" et " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" ne permet pas de mesurer directement l'activité de cette dernière sur une suspension de membranes. Lorsque les ions magnésium, sodium, et potassium existent dans le milieu, les deux enzymes fonctionnent et on mesure une vitesse totale de l'hydrolyse de l'ATP.

Deux méthodes sont généralement utilisées pour séparer l'activité dépendante du sodium et potassium de celle dépendante uniquement du magnésium.

- On peut mesurer la vitesse d'hydrolyse dans un milieu contenant Mg^{2+} , Na^+ et K^+ en l'absence, puis en présence de ouabaine 10^{-4} M/l. La

différence des valeurs obtenues est due à l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante". Cette technique est souvent employée lorsque l'activité ATPasique est mesurée par dosage du phosphate inorganique libéré d'après FISKE et SUBBAROW, car la réaction d'hydrolyse se fait à forte concentration en ATP et magnésium pendant une durée qui varie selon les laboratoires, mais qui est en général de 30 min. environ. Dans ce cas, le temps de latence qui précède l'inhibition par l'ouabaïne n'est pas gênant. En effet, l'ouabaïne n'agit pas immédiatement sur le système transporteur, et dans les conditions utilisées dans ce travail, le temps de latence nécessaire pour obtenir une inhibition est d'environ 5 min. Ainsi, pour mesurer une vitesse initiale d'hydrolyse de l'ATP, la réaction s'effectuant en quelques minutes, il serait nécessaire de réaliser une préincubation des membranes dans le milieu réactionnel avec et sans ouabaïne.

- Nous préférons utiliser l'autre méthode qui consiste à déterminer l'activité enzymatique en présence de magnésium, sodium et potassium, puis en un deuxième temps en présence de magnésium seulement. Dans ce deuxième milieu, les cations monovalents sont remplacés par de la choline afin qu'il n'y ait pas de variation de force ionique. La valeur ainsi obtenue par soustraction correspond bien à l'activité sensible à la ouabaïne, les ions Na^+ et K^+ du milieu ne modifiant pas l'activité " Mg^{2+} -dépendante".

Protocole expérimental

La réaction d'hydrolyse de l'ATP est réalisée à 37°C dans 5 ml d'un milieu pH 8 contenant : 0,25 ml de suspension de membrane (soit environ 1 mg de protéines membranaires déterminées par la méthode de LOWRY), Tris 10 mM/l, Cystéine 1 mM/l, Mg^{2+} - Na^+ - K^+ -choline dont les concentrations sont définies pour chaque expérience et indiquées sous les courbes correspondantes. L'ATP (0,1 ml) est injecté au temps zéro de la réaction sous forme ATP-Tris préparé à partir d'une solution d'ATP- Na_2 par chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

Des prises de 0,25 ml faites à des intervalles de temps régulier permettent de mesurer l'ATP restant en solution par la technique définie précédemment.

On obtient ainsi des courbes représentant la variation en fonction du temps de la lumière émise, $h\nu = f(t)$ (figure 3).

A l'aide des points initiaux des courbes réalisées à différentes concentrations en ATP ($12 \mu\text{M/l}$ - $4 \mu\text{M/l}$ - $2 \mu\text{M/l}$ pour l'expérience correspondant à la figure 3), on trace la courbe d'étalonnage du système luciférine-luciférase et la pente en chaque point de celle-ci donne la correspondance entre la variation de lumière et la variation d'ATP. La détermination de la pente initiale d'une courbe $h\nu = f(t)$ permet alors de connaître la vitesse initiale de la réaction. Il suffit alors de diviser cette pente à l'origine $\frac{d(h\nu)_0}{dt}$ par la valeur de la pente de la tangente à la courbe d'étalonnage du système luciférine-luciférase au point d'abscisse $(\text{ATP})_0$, concentration initiale en ATP.

La vitesse initiale de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" est obtenue en retranchant de celle mesurée dans le milieu " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ ", celle mesurée dans le milieu Mg^{2+} . Cette méthode est justifiée si l'on suppose la concentration en substrat grande devant les concentrations en enzyme (DIXON et WEBB 1964).

Le fait que cette activité ATPasique soit liée au système de transport des cations à travers la membrane peut faire craindre qu'il y ait interaction entre les étapes ultérieures du transfert et l'hydrolyse de l'ATP. Cependant, comme on mesure la vitesse initiale de la réaction, l'hypothèse d'une altération de celle-ci par l'accumulation éventuelle d'un élément de la chaîne transporteuse est peu probable.

La vitesse initiale mesurée pour chaque enzyme à plusieurs concentrations en substrat permet de déterminer les valeurs de la constante de Michaelis et de la vitesse maximum apparente. Il est d'abord nécessaire de montrer que, dans le domaine des concentrations en ATP auquel nous travaillons, les enzymes ont un comportement Michaelien. C'est ce que montre la figure 4, où les courbes a, b, traitées en Lineweaver-Burk

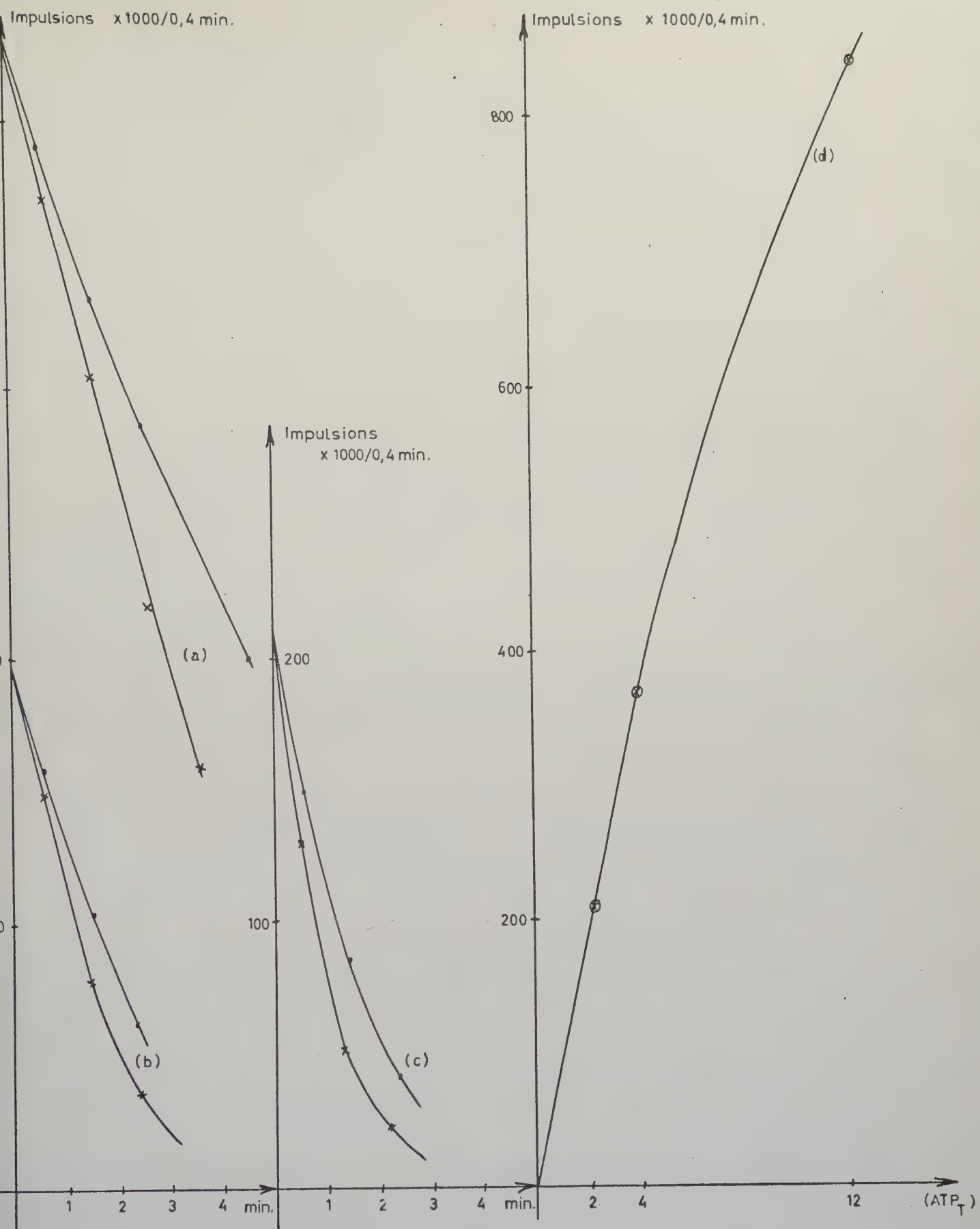


Fig.3 - Courbes relatives à la cinétique de l'hydrolyse de l'ATP.

Milieu réactionnel: Tris=10mM/l - Cyst=2mM/l - $(Mg^{2+})=50\mu M/l$ pH=8

Choline = 66mM/l - Na=60mM/l - K = 6mM/L.

(a)-ATP: 12 $\mu M/L$ (b)-ATP: 4 $\mu M/L$ (c)-ATP: 2 $\mu M/L$ (d) - courbe d'étalonnage du système enzymatique Luciférine-luciférase.

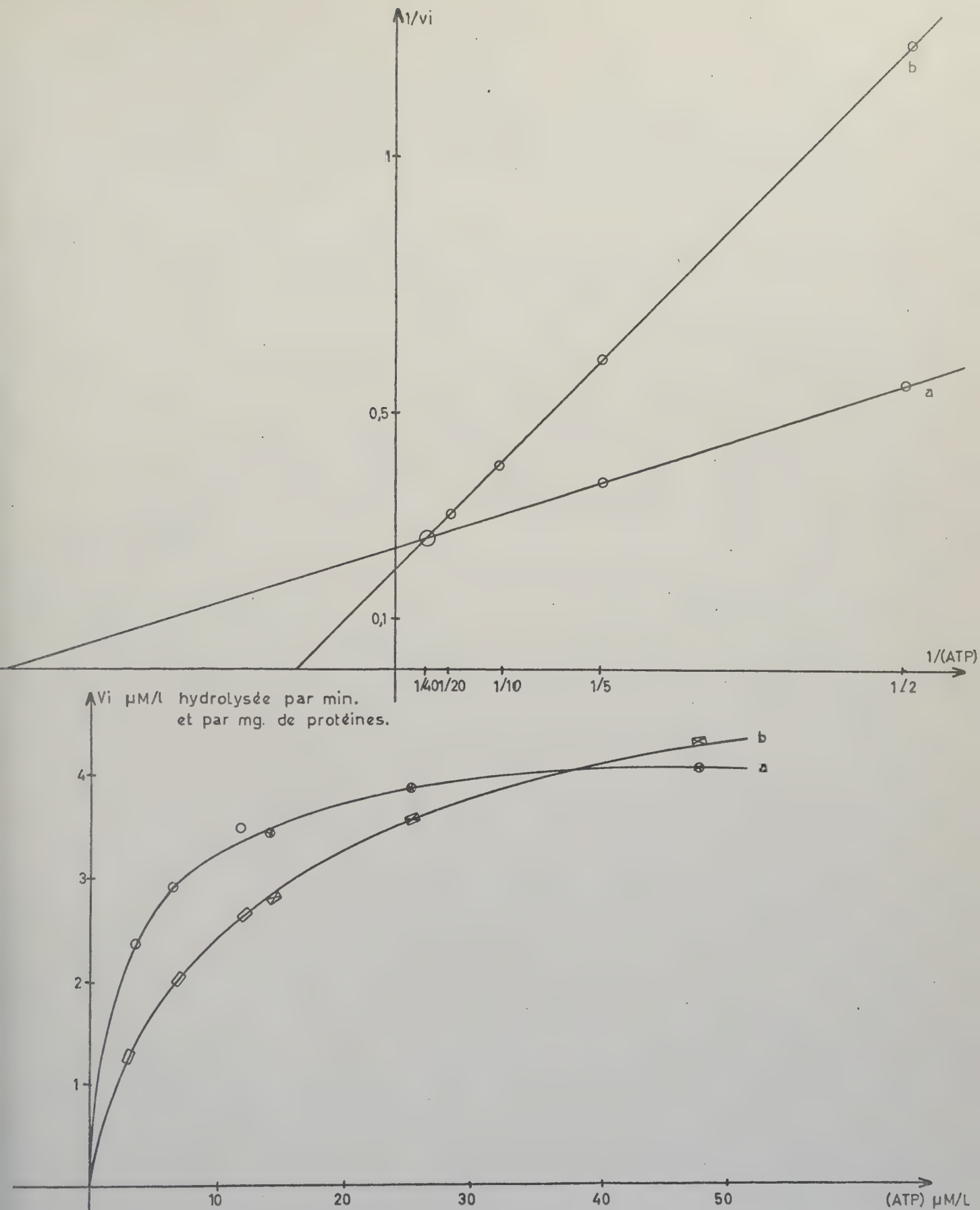


Fig. 4 - Détermination de K_m et V_m avec deux dilutions de Luciferine - Luciférase

Milieu : Tris 10mM/L - Cyst. 2mM/L - (Mg^{2+}) 20 $\mu M/L$, PH.8 - $\circ$ et $\otimes$ choline 66mM/L

$\square$ et $\boxtimes$ Na^+ 60mM/L - K^+ 6mM/L

ATP : 3,4 - 6,5 - 12 $\mu M/L$ $\circ$ et $\square$

ATP : 13,5 - 25,5 - 48 $\mu M/L$ $\otimes$ et $\boxtimes$

indiquent que l'équation de la vitesse initiale est de la forme :

$$v_i = V_m \frac{S}{K_m + S}$$

où S est la concentration en complexe $MgATP^{2-}$ qui, nous le verrons ultérieurement, est le substrat réel de la réaction.

Il semble que la technique utilisée n'introduit pas d'artéfacts dans la détermination de K_m et V_m , car avec deux domaines voisins de concentrations en ATP et deux dilutions adéquates du système luciférase, les courbes obtenues conduisent aux mêmes valeurs de ces constantes.

Un certain nombre de remarques doivent être faites quant à cette technique :

- Pour certaines expériences, les points initiaux correspondant à une même concentration en ATP des courbes $hv = f(t)$ réalisées dans les milieux " Mg^{2+} " et " $Mg^{2+}-Na^+-K^+$ " sont parfois différents. Il en résulte alors pour le système luciférine-luciférase deux courbes d'étalonnage. Chacune d'elles est utilisée pour déterminer les vitesses initiales de l'activité ATPasique dans le milieu correspondant.

- Lorsque des mesures sont faites pour différents milieux à une seule concentration en ATP, il n'est pas nécessaire de connaître la courbe d'étalonnage. Les vitesses s'expriment alors en unité arbitraire $\frac{\Delta(hv)}{dt}$ à condition de ramener les points initiaux à une même valeur.

- Cette méthode graphique donne des résultats rapides et immédiatement utilisables, permettant d'adapter le déroulement de l'expérience. Cependant, l'exactitude de la vitesse mesurée est fonction de la précision du tracé de la tangente aux courbes. Pour obtenir une plus grande précision l'ATPase " Mg^{2+} dépendante" étant considérée comme Michaelienne, on détermine le K_m et la V_m en Lineweaver-Burk et on ajuste leur valeur de telle façon que les courbes $hv = f(t)$ obtenues sur calculatrice (Programma 102) correspondent aux courbes expérimentales. La vitesse initiale est alors

calculée à partir de : $v_i = \frac{V_m \cdot (\text{substrat})}{K_m + (\text{substrat})}$

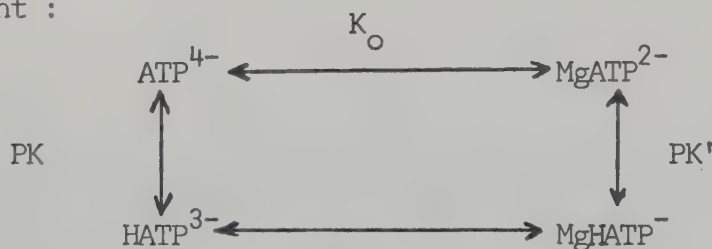
Ce procédé améliore également la précision de la vitesse initiale de l'ATPase "Mg²⁺-Na⁺-K⁺ dépendante" obtenue par différence.

3) Détermination de la constante d'équilibre du complexe MgATP²⁻

Pour tous les enzymes utilisant comme substrat l'ATP, le cation Mg²⁺ intervient pour former le complexe MgATP²⁻ qui, selon certains auteurs, se présenterait dans une configuration spatiale repliée lui permettant de s'adapter aux sites actifs de l'enzyme (39). La cinétique d'hydrolyse de l'adénosine triphosphate par les ATPases membranaires doit donc être interprétée en fonction de leur substrat réel, le complexe Mg-ATP²⁻. Plusieurs méthodes permettant de connaître la constante d'équilibre de ce chélat ont été décrites, mais les valeurs varient selon les conditions de mesure employées, les techniques et les milieux considérés (40) (41)(42).

C'est la raison pour laquelle nous avons pensé utiliser la cinétique du système luciférine-luciférase pour déterminer la constante d'équilibre de ce complexe dans les milieux réactionnels employés lors de cette étude (43)

A pH 8, qui est celui de nos milieux réactionnels, les différentes formes de l'ATP et de son complexe peuvent être représentées par le schéma suivant :



où
$$K_O = \frac{(\text{Mg}^{2+} \text{ libre}) (\text{ATP}^{4-})}{(\text{MgATP}^{2-})}$$

et pK = 7, pK' = 5,26 (44)

Le rapport des concentrations en MgHATP^- et MgATP^{2-} s'écrit :

$$\frac{(\text{MgATP}^{2-})}{(\text{MgHATP}^-)} = \frac{10^{-\text{PK}'}}{10^{-\text{PH}}} = 550$$

On peut donc négliger le terme MgHATP^- .

De la même façon, il vient :

$$\frac{(\text{ATP}^{4-})}{(\text{HATP}^{3-})} = \frac{10^{-\text{PK}}}{10^{-\text{PH}}} = 10$$

Ce dernier rapport est constant quelque soit la concentration en magnésium et la présence de HATP^{3-} dans le milieu, si elle modifie la valeur apparente de la constante d'équilibre du complexe MgATP^{2-} , n'affecte pas sa mesure. Nous avons en effet :

$$K_0 \text{ apparent} = K_0 \left(1 + \frac{(\text{H}^*)}{10^{-7}} \right)$$

L'ordre de grandeur de la constante K_0 apparent étant connu, on peut déterminer pour le milieu utilisé une concentration en magnésium pour laquelle le rapport $\frac{(\text{MgATP}^{2-})}{(\text{ATP total})}$ est supérieur à 95%. Dans ces conditions, les solutions d'adénosine triphosphate sous forme de sel disodique étant faites en tampon Tris HCl, 0,1 ml d'ATP est ajouté à 4,8 ml du milieu réactionnel contenant du magnésium à la concentration calculée. Puis le protocole expérimental se poursuit comme celui décrit lors du dosage de l'ATP. 0,1 ml de la préparation luciférine-luciférase est injecté rapidement et après agitation, la lumière émise est mesurée. En répétant cette opération à l'aide du même milieu réactionnel mais à des concentrations plus faibles en ATP, on obtient ainsi une série de mesures qui permet de tracer une courbe $h\nu = f(\text{ATP total})$ qui sert d'étalonnage (Fig.5 - courbe I).

Si pour le même milieu, la concentration en magnésium est inférieure, la chélation de l'ATP est moindre et le substrat réel de la luciférase étant le complexe MgATP^{2-} , la quantité de lumière est plus faible.

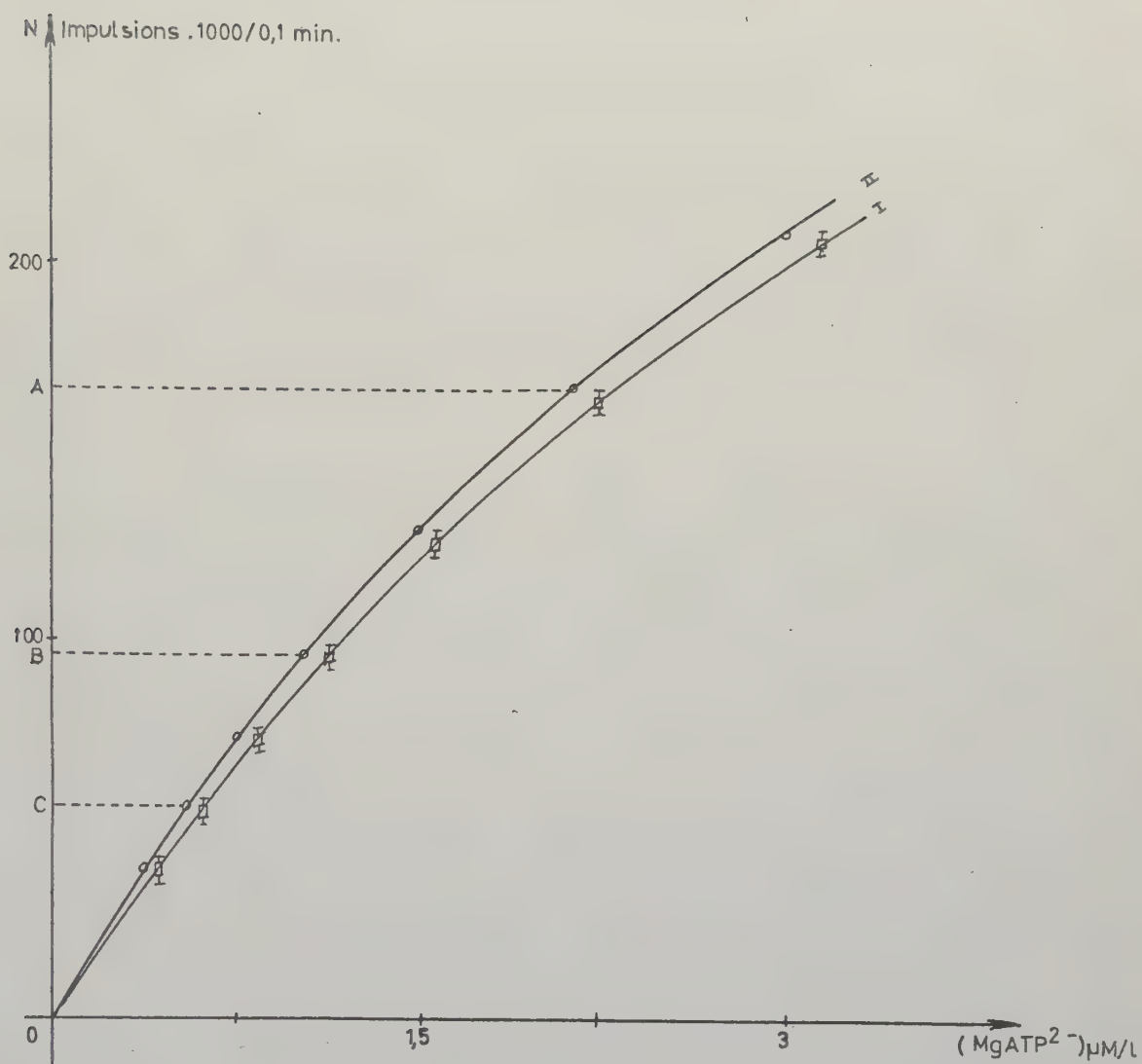


Fig.5- Courbes d'étalonnage du système luciférine - luciférase

- Milieux réactionnels : pH 8 - 20°C - Tris 10mM/l - Choline 80mM/l -
 Mg^{2+} 0,5mM/l pour les courbes I et II - Mg^{2+} 0,044 mM/l pour les points A, B, C.
 - ATP total = 3,1 - 1,6 - 0,82 - 0,43mM/l.

En reportant celle-ci sur la courbe définie précédemment (points A, B, C, figure 5), on évalue la concentration en MgATP^{2-} ; par différence, on obtient celle de l'ATP libre et du métal libre ce qui permet de déterminer une valeur de K_0 apparent.

On affine alors la courbe d'étalonnage en remplaçant dans le tracé de celle-ci les concentrations en ATP total par celles des complexes en MgATP^{2-} correspondants (figure 5, courbe II). En répétant l'opération définie précédemment, une nouvelle valeur est obtenue pour K_0 apparent ; elle est peu différente du premier résultat et il n'est pas nécessaire de tracer une troisième courbe d'étalonnage.

Une telle détermination de la constante est réalisée à trois concentrations en ATP et une moyenne des résultats est prise comme valeur de K_0 apparent. Dans l'exemple présenté par la figure 5, les valeurs de K_0 apparent obtenues à 20°C pour des concentrations en ATP total égales à 3,1 - 1,6 - 0,82 $\mu\text{M}/1$ sont respectivement $20 \pm 1 \cdot 10^{-6} \text{M}$, $21 \pm 1 \cdot 10^{-6} \text{M}$, $20 \pm 1 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

L'erreur sur K_0 est déterminée à partir de l'erreur faite sur le nombre d'impulsions données par le photomultiplicateur qui est de 2 à 3%. A 20°C, sur dix expériences réalisées, les valeurs trouvées varient entre 19 et $22 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

Pour dépouiller les résultats concernant l'hydrolyse de l'ATP par les ATPases membranaires, il est nécessaire de connaître la valeur de K_0 à 37°C. Le système luciférine-luciférase n'étant pas stable à cette température, plusieurs déterminations de cette constante sont réalisées entre 4°C et 20°C. Les valeurs de $\text{Log } K_0$ apparent portées en fonction de $\frac{1}{T}$ sur la figure 6 se distribuent autour d'une droite et le domaine d'extrapolation étant peu étendu, on détermine à partir de celle-ci la valeur de K_0 à 37°C qui est trouvée égale à $13 \pm 2 \cdot 10^{-6} \text{M}$. La précision sur cette valeur est environ de 10 pour cent.

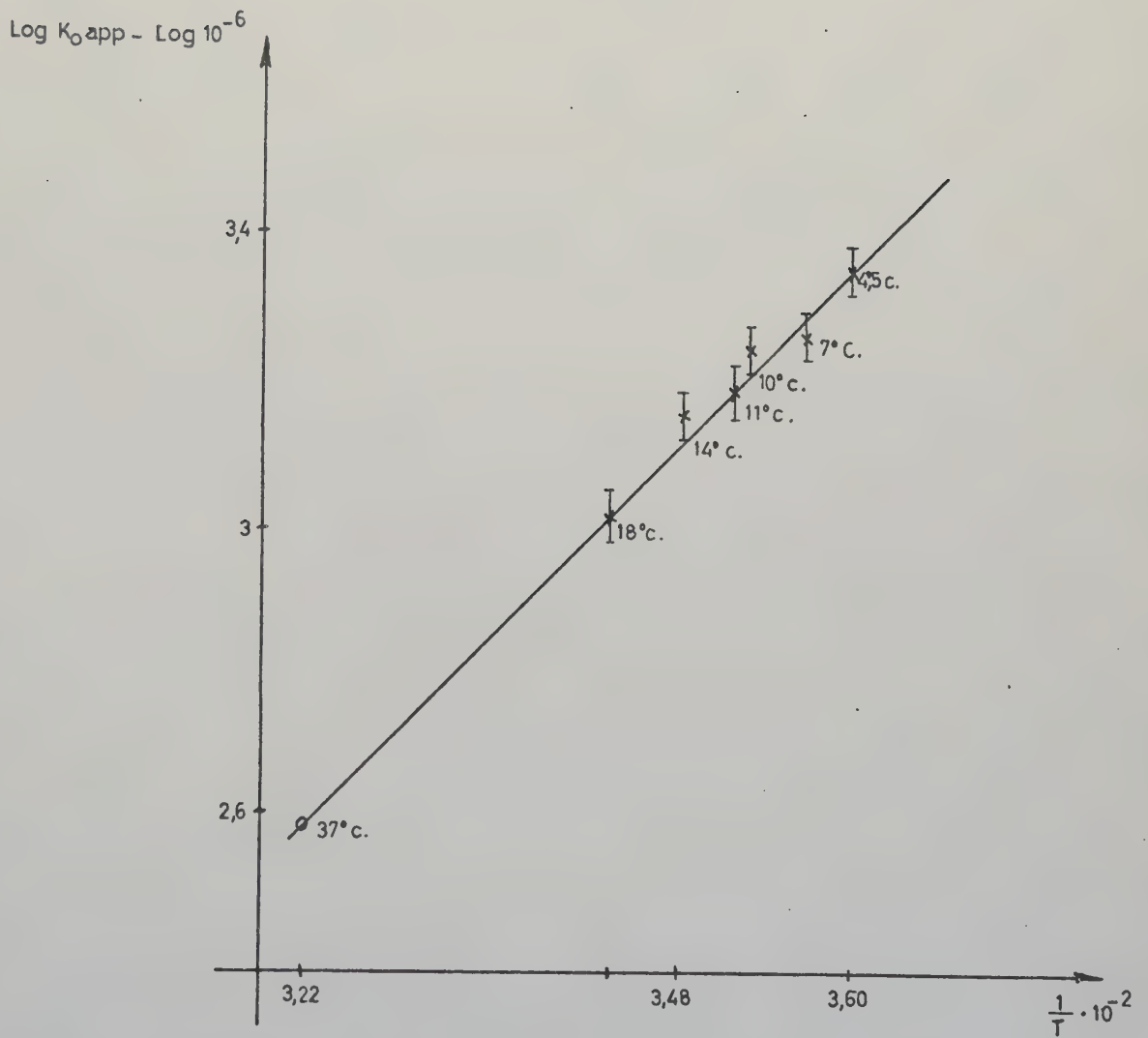


Fig. 6 - Determination de la constante K. à 37°C par extrapolation

Cette méthode n'est valable que dans la mesure où il n'existe pas sur l'enzyme de compétition entre le complexe MgATP^{2-} et le métal libre ou/et l'ATP libre. Or, nous avons pu montrer qu'il n'existe pas de modification des paramètres K_m et V_m de l'enzyme jusqu'à une concentration en magnésium total de 1 mM/l. D'autre part, l'inhibition par l'excès d'ATP libre peut être éliminé, puisqu'elle devrait entraîner une augmentation des valeurs obtenues pour K_o lorsque la concentration en ATP total augmente.

Ainsi, la méthode décrite pour la détermination de la constante d'équilibre du complexe MgATP^{2-} donne des résultats du même ordre de grandeur que ceux obtenus par microcalorimètre (45) et par mesure spectrométrique du complexe MgOH quinoléine (46) en milieu triéthanolamine. La technique est simple, très rapide et permet d'obtenir une précision comparable à celle des méthodes habituelles.

B) LES EFFETS DU MAGNESIUM ET DU CALCIUM
SUR LA CINETIQUE D'HYDROLYSE DE L'ATP

L'hydrolyse de l'ATP ne se fait qu'en présence de magnésium et le taux d'hydrolyse maximum a été trouvé pour un rapport ($\text{Mg}^{2+}/\text{ATP}$) égal à 1/1 (47)(48). Cela suggère que le complexe MgATP^{2-} est réellement le substrat réel de l'enzyme, ou que l'ATP se lie à l'enzyme grâce au magnésium. Mais, selon les travaux de SKOU (49), ce rapport pour l'activité maximum serait de 2/1.

En fait, il semble que les résultats trouvés varient en fonction de la concentration en ATP utilisée (50), ce qui implique un rôle plus complexe du magnésium.

D'ailleurs, pour expliquer les résultats relatifs à la transphosphorylation $\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP}$ liée à l'activité " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante", certains auteurs font intervenir deux ions Mg^{2+} au cours de la réaction d'hydrolyse dans laquelle ils décrivent deux formes d'enzymes phosphorylées et deux sites d'activation du magnésium.

Nous étudierons les modifications du comportement cinétique des ATPases " Mg^{2+} dépendante" et " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" des membranes des globules rouges humains en fonction de la concentration en magnésium.

Pour apporter des arguments en faveur du schéma réactionnel proposé au cours de ce travail, les effets du calcium ont été aussi étudiés. En effet, EPSTEIN et WHITTAM (51) ont montré que le complexe CaATP^{2-} pourrait être un substrat pour l'enzyme. Sa moindre vitesse d'hydrolyse par rapport à celle de MgATP^{2-} en fait un inhibiteur compétitif. De plus, s'il existe deux sites d'activation du magnésium, le calcium doit pouvoir interférer avec le magnésium au niveau de ces deux sites.

.../...

Les abréviations employées seront les suivantes :

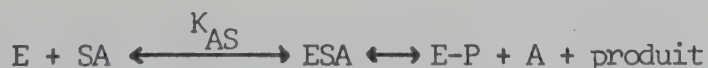
ATP	: adenosine triphosphate
E_T	: enzyme total (enzyme libre + enzyme lié)
E	: enzyme libre
$(Mg^{2+})_L = (A)$	: concentration en magnésium libre
$(Mg^{2+})_T = (A_T)$	: concentration en magnésium total
(S_T)	: concentration en substrat total
SA	: complexe $Mg-ATP^{2-}$
a	: magnésium lié sur le deuxième site de l'enzyme
B	: métal libre Ca^{2+}
SB	: complexe $Ca-ATP^{2-}$
$(Ca^{2+})_L = (B)$	: concentration en calcium libre
b	: calcium lié sur le deuxième site de l'enzyme
K	: constante d'équilibre
k	: constante de dissociation
Pi	: phosphate inorganique

1) LE MAGNESIUM

Les ATPases " $Mg^{2+}-Na^+-K^+$ dépendante" et " Mg^{2+} dépendante" peuvent être considérées comme des enzymes à métal activateur, et l'étude de la cinétique de la réaction pour différentes concentrations en métal devrait permettre de choisir entre les différents modèles envisageables (52)

L'analyse des différents travaux réalisés permet de dégager un certain nombre de notions quant aux actions du magnésium.

- La première étape de la séquence réactionnelle permettant l'utilisation de l'énergie de l'ATP est habituellement schématisée, en utilisant les abréviations déjà citées par :



Puisque nous étudions la vitesse initiale de la réaction, l'équilibre entre ESA et EP se résume à la réaction :

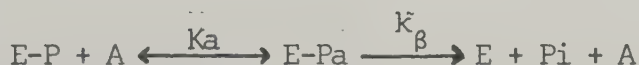


- L'enzyme peut également fixer Mg^{2+} puisqu'il existe une inhibition compétitive (50).



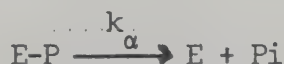
D'autre part, FAHN, KOVAL et ALBERS (53) suggèrent pour expliquer le comportement du système l'existence de deux sites d'activation par le magnésium au cours de la séquence réactionnelle.

Nous supposerons, dans l'étude qui va suivre, que l'intervention du deuxième magnésium accélère la déphosphorylation du complexe E-P. On peut écrire :



On distingue le magnésium du premier site qu'on appelle A et celui du deuxième site qu'on appelle a.

Cette dernière séquence est compatible avec :



La concentration en magnésium libre intervenant au niveau de certains équilibres, nous nous proposons d'étudier pour différentes valeurs de celle-ci l'hydrolyse du complexe MgATP^{2-} . Les concentrations en cations monovalents étant maintenues constantes, les effets du magnésium libre sur les deux sites de l'enzyme sont à l'origine des variations des coefficients V_m et K_m .

Pour analyser le mécanisme de ces interactions, nous considérons l'étude de la fonction K_m/V_m , car seule l'inhibition compétitive entre le métal activateur et le complexe $MgATP^{2-}$ peut être à l'origine d'une variation de ce rapport. En effet, comme nous allons le montrer, cette étude permet de dissocier les actions des ions (que ce soit celles du magnésium ou celles des cations monovalents) au niveau de l'étape de phosphorylation de l'enzyme de celles qui existent au niveau de la chaîne transporteuse. Quelque soit le schéma réactionnel envisagé pour l'étape de phosphorylation, la somme des concentrations des différentes formes de l'intermédiaire phosphorylé peut s'exprimer à l'aide de constantes de vitesse et d'équilibre à partir de la concentration en complexe enzyme-substrat.

$\Sigma E-P = ESA \cdot f(Mg^{2+}, Na^+, K^+)$ où $f(Mg^{2+}, Na^+, K^+)$ est une fonction des concentrations en magnésium, sodium et potassium et qui ne dépend que des interactions qui ont lieu après la phosphorylation de l'enzyme. Nous pouvons écrire la vitesse initiale de la réaction sous la forme :

$$(1) \quad v_i = k \text{ ESA}$$

La concentration en enzyme total, E_T , est égale à :

$$E_T = ESA + \Sigma EP + E$$

$$(2) \quad E_T = E \left[1 + \frac{SA}{K_S} (1 + f(Mg^{2+}, Na^+, K^+)) \right]$$

où E = concentration en enzyme libre

K_S = constante d'association du complexe enzyme-substrat.

(1) et (2) permettent d'écrire :

$$(3) \quad v_i = \frac{\frac{k E_T SA}{1 + f(Mg^{2+}, Na^+, K^+)}}{\frac{K_S}{1 + f(Mg^{2+}, Na^+, K^+)} + SA}$$

Cette équation est de la forme de celle de Michaelis.

Nous voyons que les actions des cations sur la chaîne transporteuse modifient les valeurs de la vitesse maximum et de la constante de Michaelis de l'enzyme, mais n'affectent pas celles du rapport $K_m/V_m = K_S/kE_T$ qui est indépendant de la fonction $f(Mg^{2+}-Na^+-K^+)$. Seuls, les effets de ces ions sur l'étape de phosphorylation, qu'ils se fassent à distance ou sur le site, permettent d'écrire le rapport K_m/V_m comme une fonction de Mg^{2+} ou de Na^+ et K^+ .

a) Résultats expérimentaux

Les expériences sont réalisées à des concentrations en magnésium libre égales à 10-20-40-100-200 $\mu M/l$.

A chacune de ces concentrations, on trace la courbe $v_i = f(SA)$ qui permet de déterminer les valeurs de V_m et de K_m/V_m pour des concentrations en ATP total égales à 6-12-24 $\mu M/l$.

Dans chaque cas, la concentration en complexe $MgATP^{2-}$ est donnée par :

$$SA = \frac{S_T \cdot A}{A + K_O}$$

où K_O , la constante d'équilibre de ce complexe, est déterminée selon la technique décrite dans le chapitre "Matériels et Méthodes" et prise égale à $12 \cdot 10^{-6}$ M et $24 \cdot 10^{-6}$ M dans les milieux " Mg^{2+} " et " $Mg^{2+}-Na^+-K^+$ " respectivement à 37°C.

Pour obtenir des concentrations en magnésium libre identiques, pour chaque valeur de l'ATP utilisé, le magnésium total nécessaire est calculé à partir de la formule suivante :

$$A_T = A \left(1 + \frac{S_T}{A + K_O} \right)$$

Compte tenu de la précision obtenue sur K_O , l'erreur faite sur les valeurs de (SA) et de (A_T) dans le cas le plus défavorable

$|(S_T) = 24\mu\text{M/l} ; (A) = 10\mu\text{M/l}|$ est au maximum de 5%. D'ailleurs, l'erreur sur (SA) est toujours de même signe pour les trois valeurs de (S_T) et n'affecte pas la valeur expérimentale de V_m , mais seulement celle de K_m .

Pour chaque valeur de l'ATP total utilisée, les concentrations en MgATP^{2-} n'étant pas identiques dans les deux milieux " Mg^{2+} " et " $\text{Mg}^{2+}-\text{Na}^+-\text{K}^+$ ", on ne peut obtenir l'activité de l'ATPase " $\text{Mg}^{2+}-\text{Na}^+-\text{K}^+$ dépendante" en retranchant directement l'une de l'autre les vitesses initiales mesurées. Les courbes $v_i=f(\text{SA})$ relatives aux deux milieux sont alors tracées et celle de l'ATPase " $\text{Mg}^{2+}-\text{Na}^+-\text{K}^+$ dépendante" est obtenue par soustractions point par point.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 7 et la figure 8. Ils montrent que :

- le comportement des deux ATPases est similaire. Cette observation nous conduit à faire l'hypothèse qu'un même schéma réactionnel pourrait s'appliquer aux deux enzymes quant à l'hydrolyse de MgATP^{2-} , et à admettre en particulier l'existence d'un intermédiaire phosphorylé de l'ATPase " Mg^{2+} dépendante".

- les courbes représentatives de la V_m en fonction de la concentration en magnésium libre ne passent pas par l'origine. On peut en déduire que l'ATP non chélaté ne peut se fixer sur l'enzyme, car nous devrions constater sinon, une inhibition par excès de substrat libre se traduisant par une limite nulle de V_m quand la concentration en magnésium libre tend vers zéro.

b) Etude théorique

Nous utiliserons pour le calcul de la vitesse initiale v_i de la réaction de l'hydrolyse de MgATP^{2-} le schéma réactionnel ci-dessous, dans lequel interviennent pour les deux ATPases une phosphorylation de l'enzyme à partir du substrat MgATP^{2-} , puis une déphosphorylation stimulée par Mg^{2+} .

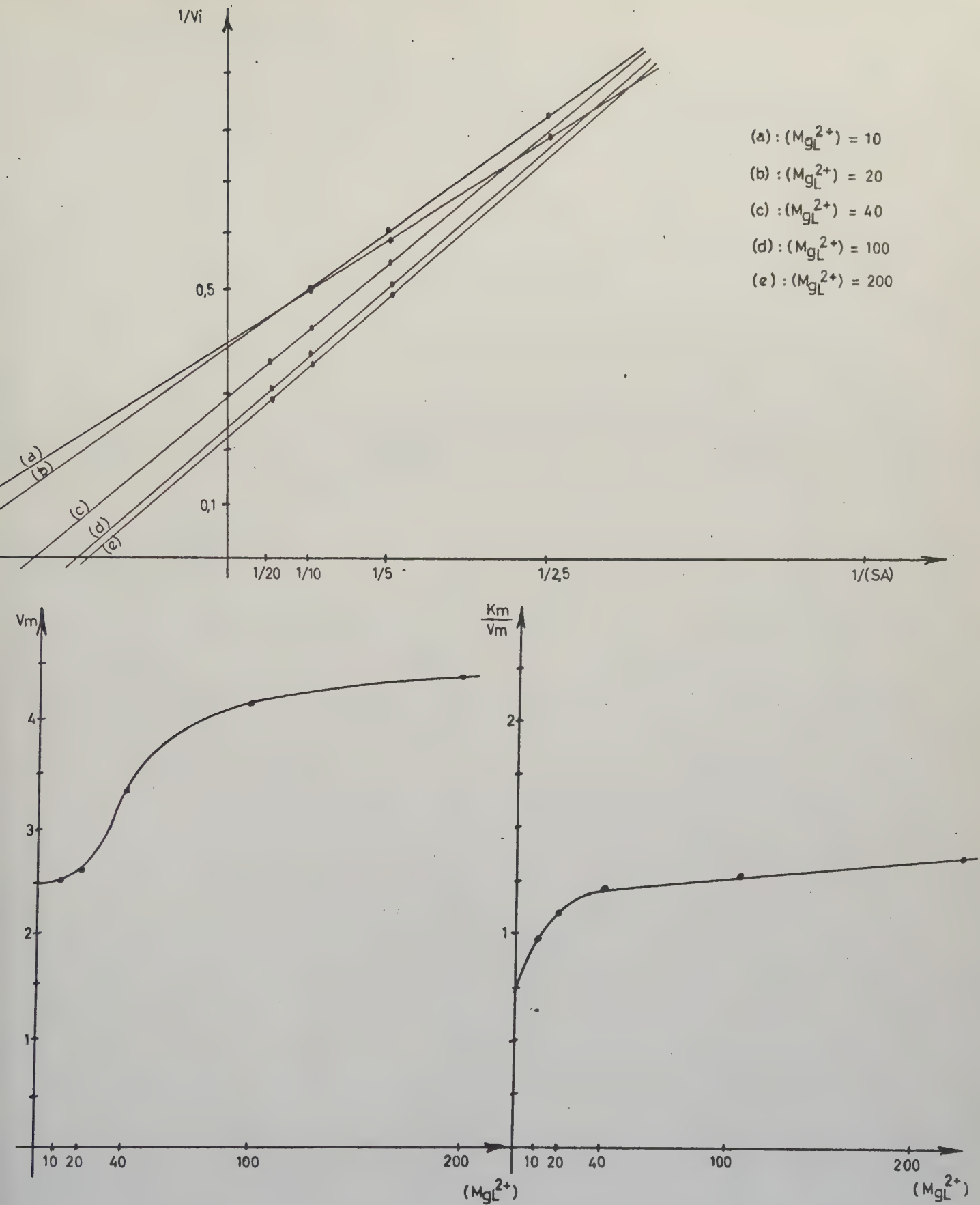


Fig. 7 - Courbes relatives à l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase « Mg^{2+} -dépendante ».

Les vitesses sont exprimées en μM d'ATP hydrolysées/min. et les concentrations en $\mu M/l$.

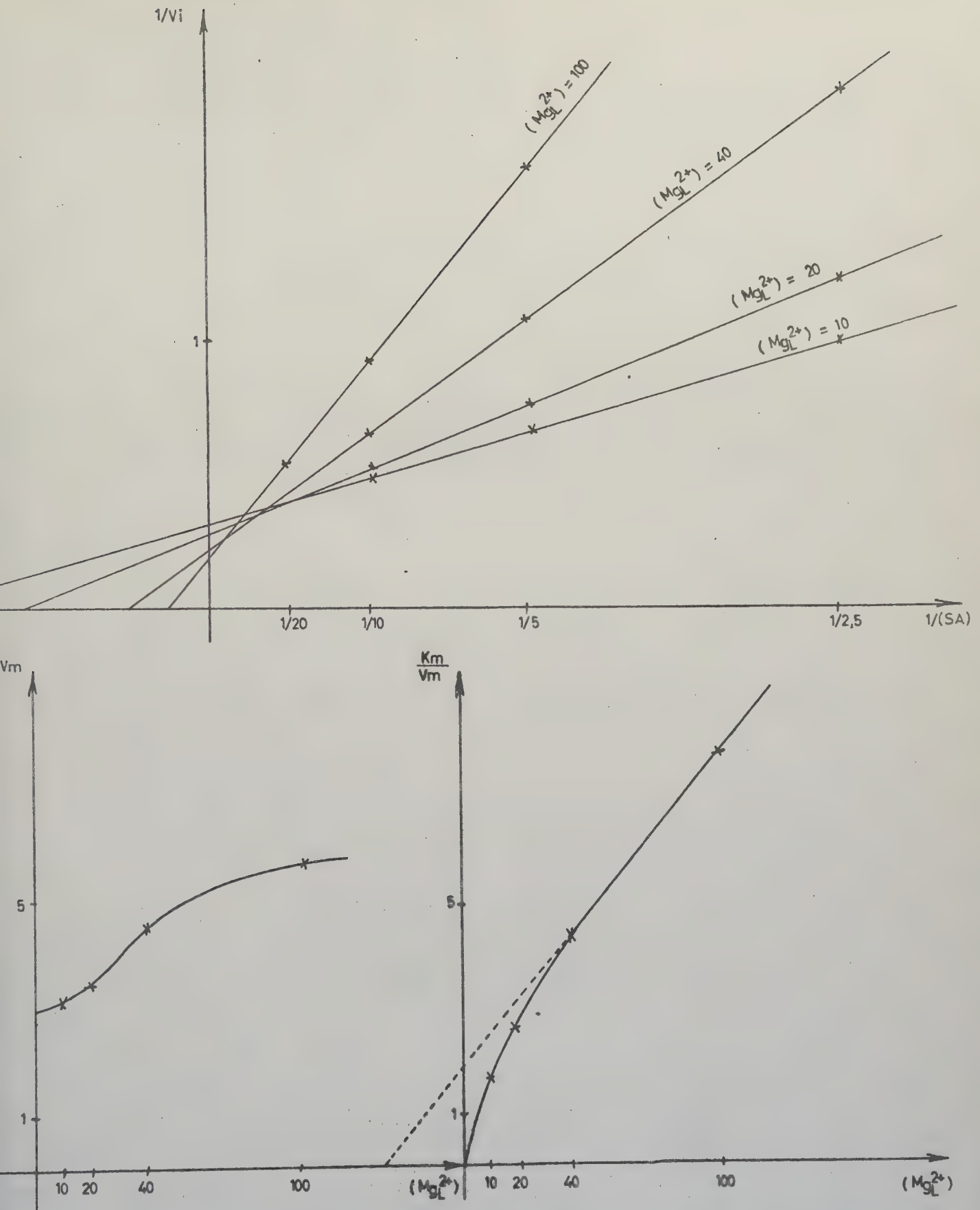
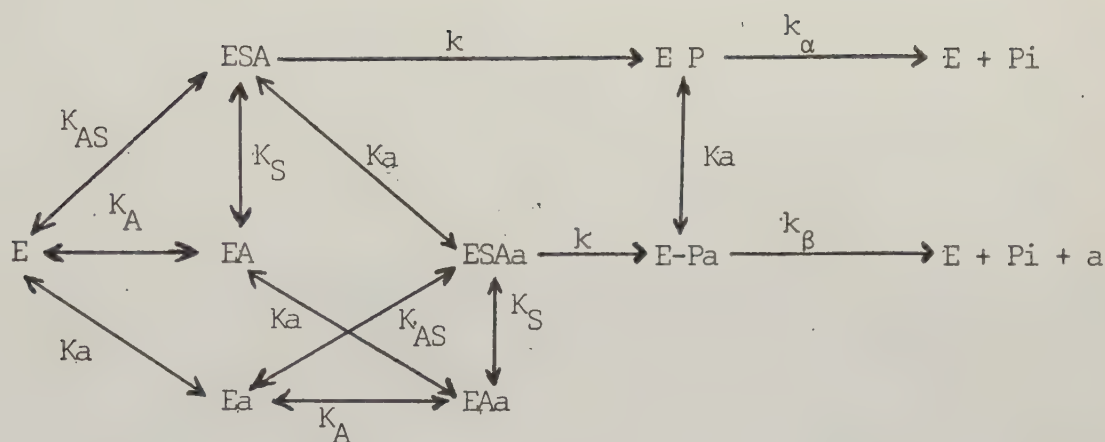


Fig. 8- Courbes relatives à l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase « Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante ». Les vitesses sont exprimées en μM d'ATP hydrolysées/min et les concentrations en $\mu M/L$.



Les complexes Ea, EAa et ESAa sont imposés au système par la présence d'un deuxième site Mg^{2+} sur l'enzyme.

Calculons la vitesse initiale de la réaction. Nous avons :

$$(4) \quad E = E_T - ESA - EA - Ea - EAa - EP - E-Pa$$

A l'équilibre, la vitesse initiale de dissociation des formes ESA, ESAa est égale à la vitesse d'apparition des formes EP, E-Pa.

$$(5) \quad v_i = k(ESA + ESAa) = k_\alpha EP + k_\beta E-Pa$$

$$\text{avec : } ESAa = \frac{ESA \cdot A}{K_a}, \quad E-Pa = \frac{EP \cdot A}{K_a} \quad \text{et} \quad ESA = \frac{E \cdot SA}{K_{AS}}$$

d'où :

$$(6) \quad v_i = \frac{E \cdot SA}{K_{AS}} \left[k \left(1 + \frac{A}{K_a} \right) \right] = EP \left[k_\alpha \left(1 + \frac{k_\beta A}{K_a} \right) \right] \quad \text{et,}$$

$$(7) \quad E = E_T - \frac{E \cdot SA}{K_{AS}} \left[\left(1 + \frac{A}{K_a} \right) + \frac{k(1 + A/K_a)}{k_\alpha (1 + Ak_\beta/K_a)} \left(1 + \frac{A}{K_a} \right) \right] - \frac{E \cdot A}{K_A} - \frac{E \cdot A}{K_a} - \frac{E \cdot A^2}{K_A K_a}$$

.../...

Soit :

$$(8) \quad V_i = \frac{\frac{k E_T}{k(1 + A/K_a)} \cdot SA}{1 + \frac{K_{AS} (1 + \frac{A}{K_a})}{k_\alpha (1 + A k_\beta / K_a)}} = \frac{V_m \cdot SA}{K_m + SA}$$

L'expression de V_m est une hyperbole en fonction de la concentration en magnésium libre, qui ne passe pas par l'origine.

Le rapport $\frac{K_m}{V_m}$ égal à $\frac{K_{AS} (1 + A/K_A)}{k E_T}$ est une droite.

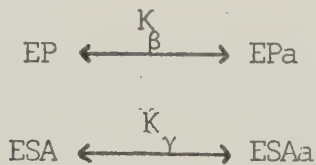
Or, si nous considérons les figures 7 et 8, nous nous apercevons que pour des concentrations en magnésium libre inférieures à 40 $\mu\text{M/l}$, les courbes expérimentales représentant les variations de V_m et de $\frac{K_m}{V_m}$ ne s'identifient pas respectivement à l'hyperbole et à la droite qu'implique le modèle envisagé. Pourtant, la précision sur la détermination de K_m et de V_m est la meilleure pour les concentrations en magnésium libre égales à 10 et 20 $\mu\text{M/l}$, car, dans ce cas, les différences de vitesses initiales mesurées dans les milieux " Mg^{2+} " et " $\text{Mg}^{2+}-\text{Na}^+-\text{K}^+$ " sont les plus élevées et les valeurs du substrat encadrent le K_m .

Les modes d'action du magnésium doivent donc être plus complexes que ceux déjà décrits.

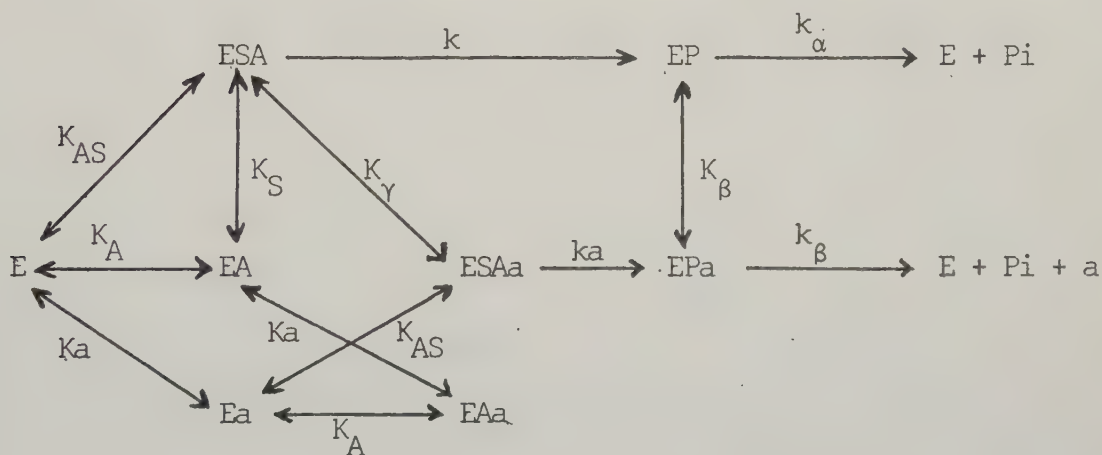
Nous supposons alors que :

1) les constantes de dissociation des complexes ESA et ESAa sont différentes du fait de la présence de Mg^{2+} sur le deuxième site. Elles deviennent respectivement k et k_a .

2) l'affinité de l'enzyme pour le deuxième magnésium est modifiée après fixation du substrat et après phosphorylation.



Le schéma devient :



La vitesse initiale s'écrit toujours sous la forme :

$$v_i = V_m \frac{SA}{K_m + SA} \quad \text{où :}$$

$$(9) \quad V_m = \frac{E_T (k + k_a A/K_Y) (k_\alpha + k_\beta A/K_\beta)}{(1 + \frac{A}{K_Y}) (k_\alpha + \frac{k_\beta \cdot A}{K_\beta}) + (k + \frac{k_a \cdot A}{K_Y}) (1 + \frac{A}{K_\beta})}$$

et :

$$(10) \quad \frac{K_m}{V_m} = \frac{K_{AS} \cdot (1 + \frac{A}{K_A}) \cdot (1 + \frac{A}{K_a})}{E_T (k + \frac{k_a \cdot A}{K_Y})}$$

Les équations (9) et (10) sont de la forme :

$$(9') \quad V_m = \frac{c A^2 + d A + e}{c' A^2 + d' A + e'}$$

$$(10') \quad \frac{K_m}{V_m} = \frac{f A^2 + g A + h}{f' A + g'}$$

On peut déterminer à l'aide d'une calculatrice deux familles de graphes représentatifs des équations (9') et (10') et, pour des constantes $c, d, \dots$ convenablement choisies, les courbes obtenues se superposent aux courbes expérimentales. Malheureusement, les valeurs des constantes $c, d, \dots$ ne permettent pas de déterminer les constantes K_i et k_i du système, mais l'allure des courbes permet d'obtenir des indications sur les valeurs relatives de certaines d'entre elles. En effet, l'équation de la V_m peut se mettre sous la forme :

$$V_m = \frac{E_T}{H_1 + H_2} \quad \text{où :}$$

$$H_1 = \frac{1 + \frac{A}{K_\gamma}}{k + K_a \frac{A}{K_\gamma}}, \quad H_2 = \frac{1 + \frac{A}{K_\beta}}{k_\alpha + k_\beta \frac{A}{K_\beta}}$$

V_m est l'inverse d'une somme de deux hyperboles. Puisque la courbe résultante est une sigmoïde, l'une des hyperboles doit croître et atteindre rapidement son maximum, l'autre décroître et atteindre plus lentement son minimum.

La déphosphorylation étant l'étape "limitante" de la réaction, nous pouvons écrire : $k > k_\alpha$; $k_a > k_\beta$.

Les valeurs limites de la vitesse maximum correspondant aux concentrations en magnésium nulle et infinie sont données par :

.../...

$$V_0 = E_T \frac{k k_\alpha}{k + k_\alpha} \quad V_\infty = E_T$$

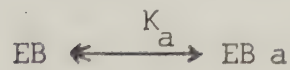
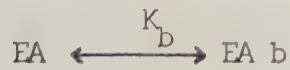
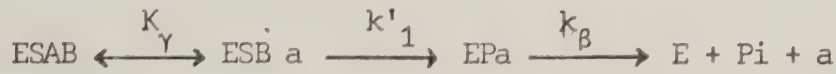
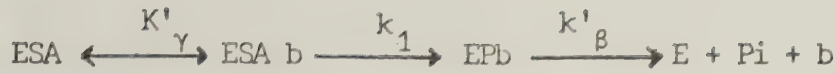
Ces deux dernières relations impliquent alors que :

$$k > k_a$$
$$k_\beta > k_\alpha$$

On montre ainsi que la déphosphorylation doit être activée par le magnésium.

Les résultats expérimentaux obtenus sont donc en faveur des hypothèses proposées quant à l'hydrolyse de l'ATP par les deux ATPases. Le point essentiel est que la vitesse maximum apparente ne tende pas vers zéro lorsque la concentration en magnésium libre diminue. Ce fait élimine l'inhibition compétitive par excès de substrat libre.

Pour expliquer les variations de V_m , il est alors nécessaire de considérer l'action de deux magnésium à deux sites distincts. Les constantes d'affinité du second magnésium avec les trois formes de l'enzyme (E ; E-P ; ESA) doivent être différentes et sa présence sur le deuxième site se traduit par une diminution de la vitesse de phosphorylation et une augmentation de la vitesse de déphosphorylation.



Calculons la vitesse initiale V_i de l'hydrolyse de l'ATP. Nous avons :

$$(11) \quad V_i = k_\alpha E-P + k_\beta EPa + k'_\beta EPb$$

$$(12) \quad V_i = k ESA + k_a ESAa + k' ESB + k'_b ESBb + k_1 ESAb + k'_1 ESBa$$

Posons :

$$\Omega_1 = k + k_a \frac{A}{K_\gamma} + k_1 \frac{B}{K'_\gamma}$$

$$\Omega_2 = k' + k'_b \frac{B}{K'_\gamma} + k'_1 \frac{A}{K_\gamma}$$

$$\Omega_3 = k_\alpha + k_\beta \frac{A}{K_\beta} + k'_\beta \frac{B}{K'_\beta}$$

$$\Omega_4 = 1 + \frac{A}{K_a} + \frac{B}{K_b}$$

$$\Omega_5 = 1 + \frac{A}{K_\beta} + \frac{B}{K'_\beta}$$

$$\Omega_6 = 1 + \frac{A}{K_\gamma} + \frac{B}{K'_\gamma}$$

La vitesse initiale V_i peut s'écrire :

$$(13) \quad V_i = \frac{E_T \left(\frac{SA}{K_{AS}} \cdot \Omega_1 + \frac{SB}{K_{BS}} \cdot \Omega_2 \right)}{\Omega_4 \left(1 + \frac{A}{K_A} + \frac{B}{K_B} \right) + \frac{SA}{K_{AS}} \left(\Omega_6 + \frac{\Omega_1}{\Omega_3} \cdot \Omega_5 \right) + \frac{SB}{K_{BS}} \left(\Omega_6 + \frac{\Omega_2}{\Omega_3} \cdot \Omega_5 \right)}$$

Si K'_O représente la constante d'équilibre du complexe CaATP^{2-} , on peut exprimer SB en fonction de B.

$$\frac{SB}{SA} = \frac{K_O}{K'_O} \cdot \frac{B}{A}$$

$$\text{d'où : } SB = \frac{K_O}{K'_O} \frac{B}{A} SA$$

On a alors :

$$(14) \quad V_i = \frac{E_T \left(\frac{\Omega_1}{K_{AS}} + \frac{\Omega_2}{K_{BS}} + \frac{K_O B}{K'_O A} \right)}{\frac{1}{K_{AS}} \left(\Omega_6 + \frac{\Omega_1}{\Omega_3} \Omega_5 \right) + \frac{K_O B}{K'_O A K_{BS}} \left(\Omega_6 + \frac{\Omega_2}{\Omega_3} \Omega_5 \right)} \cdot SA$$

$$+ \frac{\Omega_4 \left(1 + \frac{A}{K_A} + \frac{B}{K_B} \right)}{\frac{1}{K_{AS}} \left(\Omega_6 + \frac{\Omega_1}{\Omega_3} + \Omega_5 \right) + \frac{K_O B}{K'_O A K_{BS}} \left(\Omega_6 + \frac{\Omega_2}{\Omega_3} \Omega_5 \right)} \cdot SA$$

Les fonctions de V_m et $\frac{K_m}{V_m}$ dépendent donc simultanément des concentrations en magnésium libre et en calcium libre. Si nous conservons constante la concentration en magnésium libre, les fonctions V_m et $\frac{K_m}{V_m}$ sont alors de la forme :

$$(15) \quad V_m = \frac{m B^3 + n B^2 + p B + q}{m' B^3 + n' B^2 + p' B + q'}$$

$$(16) \quad \frac{K_m}{V_m} = \frac{r B^2 + s B + t}{r' B^2 + s' B + t'}$$

Deux séries d'expériences ont été effectuées :

- Pour l'une, la vitesse initiale de l'hydrolyse de l'ATP correspondant aux deux ATPases est étudiée en fonction des concentrations en calcium libre 0-4-10-20 $\mu\text{M/l}$, ceci pour une concentration constante en magnésium libre égale à 50 $\mu\text{M/l}$.

- L'autre est réalisée à 200 $\mu\text{M/l}$ de magnésium libre et la concentration en magnésium libre prend les valeurs 0-10-30-50 $\mu\text{M/l}$.

Pour chaque courbe $v_i = f(\text{SA})$, la concentration en complexe MgATP^{2-} est calculée selon :

$$\text{SA} = \frac{S_T \cdot A}{A + K_O + \frac{K'_O}{K''_O} B}$$

où K'_O représente la constante d'équilibre du complexe CaATP^{2-} .

L'ATP total utilisé est 2-4-12 $\mu\text{M/l}$.

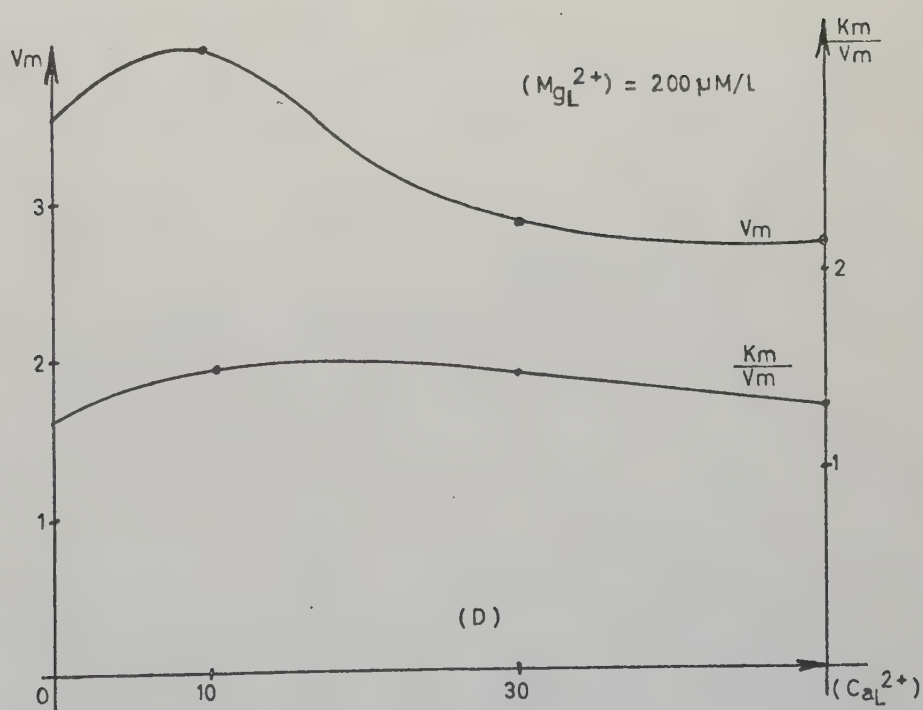
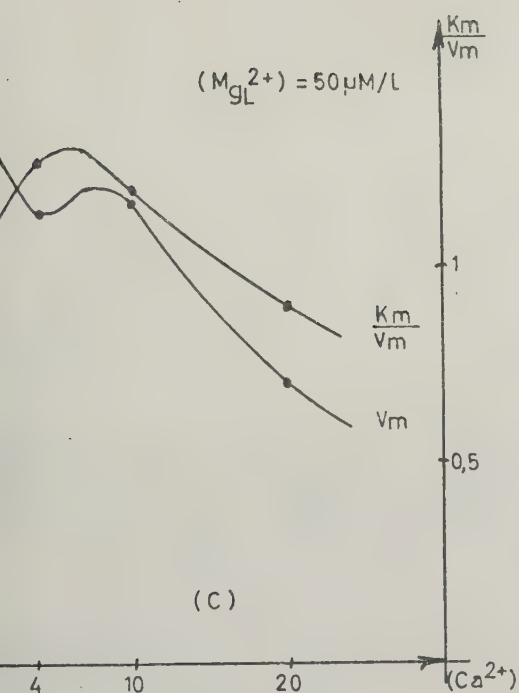
Pour réaliser chaque expérience, les concentrations en magnésium total et en calcium total nécessaires sont calculées à partir des formules suivantes :

$$A_T = A \left(1 + \frac{S_T}{A + K_O + \frac{K'_O}{K''_O} B} \right)$$

$$B_T = B \left(1 + \frac{S_T}{B + K'_O + \frac{K_O}{K''_O} A} \right)$$

La constante K'_O ne peut être déterminée à l'aide de la méthode utilisée pour la mesure de K_O , constante d'équilibre de MgATP^{2-} . Mais, les résultats déjà publiés (55)(56) nous ont conduits à prendre une valeur de K'_O égale à trois fois celle de K_O . D'ailleurs, dans le cas le plus défavorable, une imprécision de 30 à 40% sur la valeur de la constante K'_O n'entraîne qu'une variation de 5% sur SA, A et B.

Les résultats expérimentaux sont présentés sur les figures 9 et 10. La préparation de membranes utilisée pour l'expérience à $\text{Mg}_L^{2+} = 50 \mu\text{M/l}$ est différente de celle utilisée pour l'expérience à $\text{Mg}_L^{2+} = 200 \mu\text{M/l}$.



g.9 - Courbes représentant les variations de V_m et de $\frac{K_m}{V_m}$ en fonction de (Ca^{2+}_L) , pour l'ATPase « Mg^{2+} dépendante».

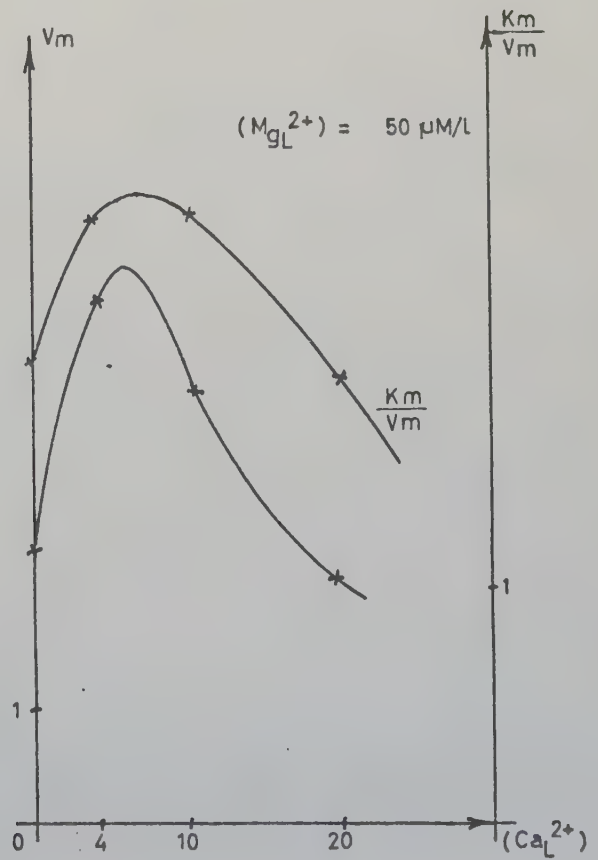
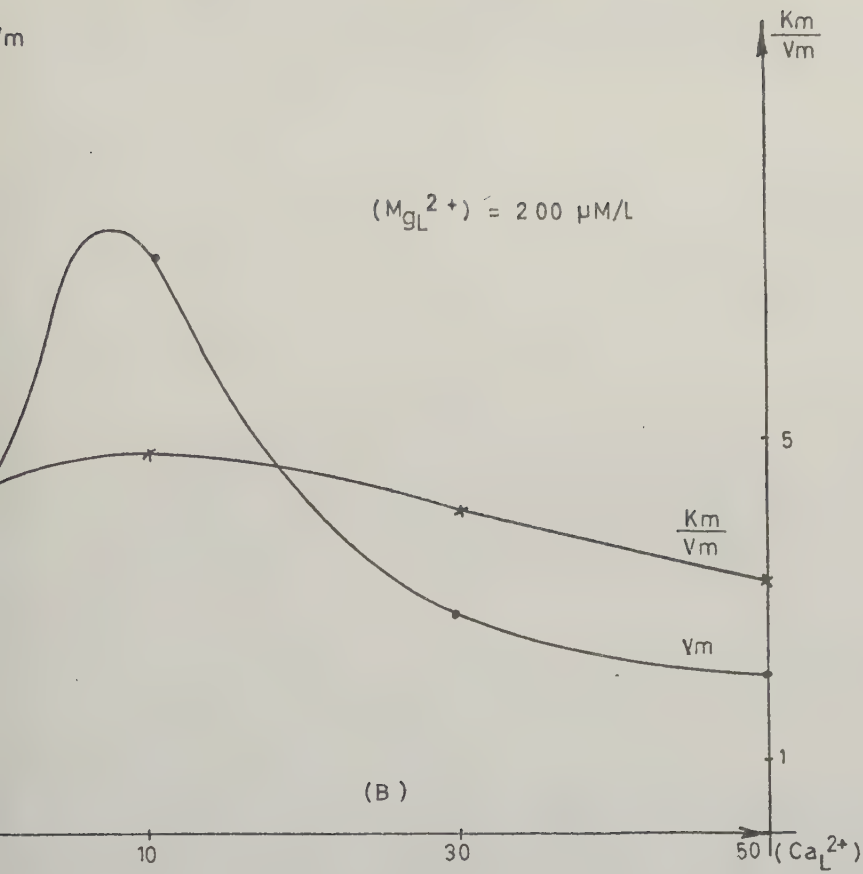


Fig.10 - Courbes représentant les variations de V_m et $\frac{K_m}{V_m}$ en fonction de (Ca_L^{2+}) , pour l'ATPase « $Mg^{2+} - Na^+ - K^+$ dépendante »

Pour les deux ATPases, les effets du calcium sont atténués lorsque l'on augmente la concentration en magnésium, ce qui justifie l'hypothèse précédente d'une compétition entre les deux ions au niveau des mêmes étapes de la réaction d'hydrolyse de l'ATP.

Les variations de V_m et de $\frac{K_m}{V_m}$ données par les équations (15) et (16) peuvent rendre compte des résultats expérimentaux si les constantes obéissent à certaines conditions, en particulier :

- Le complexe CaATP^{2-} doit être un substrat pour l'enzyme. En effet, si la constante K_{BS} est infinie, ou si les valeurs de k'_1 , k'_b , k' sont nulles, les équations de V_m et de $\frac{K_m}{V_m}$ se simplifient et ne correspondent plus aux courbes expérimentales.

- Le calcium doit intervenir sur le deuxième site du magnésium car pour les mêmes raisons les valeurs de K_b , K'_γ , K'_β ne peuvent être infinies.

Dans ces expériences, pour les concentrations en calcium les plus élevées ($10\mu\text{M/l}$ environ), l'inhibition habituellement décrite (57) de l'ATPase " $\text{Mg}^{2+}\text{-Na}^+\text{-K}^+$ dépendante" est retrouvée. Cela peut être expliqué par une compétition entre Mg^{2+} et Ca^{2+} au niveau du deuxième site de l'enzyme, le calcium ralentissant la déphosphorylation. En effet, l'ATPase " $\text{Mg}^{2+}\text{-Na}^+\text{-K}^+$ dépendante" ne fonctionne pas dans un milieu " $\text{Ca}^{2+}\text{-Na}^+\text{-K}^+$ " alors que CaATP^{2-} est un substrat pour l'enzyme.

Ainsi, l'étude cinétique en fonction de la concentration en calcium libre apporte peut-être un autre argument en faveur du modèle réactionnel relatif à l'hydrolyse de l'ATP proposé pour rendre compte des effets du magnésium. Mais, ces résultats ne peuvent être interprétés qu'avec beaucoup de prudence. En effet, les travaux de SCHATZMANN (58), de DUNHAM et GLYNN (59) et de WINS (60) ont montré qu'il existait dans les "ghosts" d'érythrocytes humains une ATPase " $\text{Mg}^{2+}\text{-Ca}^{2+}$ dépendante" qui pouvait être reliée au transport actif du calcium. VINCENZY (61) obtient un maximum d'activation de l'ATPase pour une concentration en calcium égale à 10^{-4} M/l dans un milieu réactionnel contenant 2 mM/l d'ATP et 5 mM/l de Mg^{2+} . Dans le domaine

des concentrations en substrat et en magnésium libre auxquelles nous travaillons, nous ne retrouvons pas cette même activation. Il est probable que compte tenu de nos conditions expérimentales, l'ATPase " Mg^{2+} - Ca^{2+} dépendante" n'est pas révélée.

Parmi les résultats décrits, le plus surprenant nous paraît être le fait qu'un même schéma réactionnel d'hydrolyse de l'ATP puisse expliquer les cinétiques observées des deux ATPases. Cela implique la phosphorylation de l'enzyme " Mg^{2+} dépendante" et l'existence de deux sites d'activation du magnésium pour cet enzyme.

Il existe certainement d'autres façons d'expliquer les phénomènes observés et d'autres hypothèses peuvent être faites, mais cette dernière observation pourrait être considérée comme un argument en faveur de la théorie proposant que les ATPases " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" et " Mg^{2+} dépendante" représentent deux formes d'un même enzyme (62). Dans cette éventualité, il est plus facile de concevoir un équilibre entre les deux formes de l'enzyme si, comme modèle de système transporteur, est choisi celui qui fait intervenir l'existence de petites molécules dont les liaisons avec l'enzyme sont labiles. Dans cette hypothèse, et compte tenu des résultats décrits dans la littérature, on ne peut considérer qu'il y a équilibre entre les deux états dans le milieu réactionnel, mais plutôt répartition entre ces deux formes au moment de la préparation des membranes.

C) ETUDE DU COMPORTEMENT CINETIQUE
DE L'ATPASE " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ DEPENDANTE"
EN FONCTION DES IONS SODIUM ET POTASSIUM

L'hydrolyse de l'ATP est couplée à un efflux de sodium et à un influx de potassium, mais les mécanismes par lesquels ces deux cations agissent sur l'activité enzymatique ne sont pas encore bien définis. Pour certains auteurs, Na^+ et K^+ agissent comme des effecteurs allostériques sur des sites différents de ceux de phosphorylation et de transfert et stabilisent l'enzyme dans une forme favorable au transport des ions. Pour d'autres au contraire, Na^+ et K^+ agissent directement au niveau de ces sites en déplaçant les équilibres qui existent entre les différentes formes de l'intermédiaire phosphorylé. Dans ce cas, les ions transportés sont ceux qui modulent le turn over du système.

Puisque la cinétique d'hydrolyse de l'ATP est sous la dépendance du sodium et du potassium, l'étude des variations des paramètres cinétiques K_m et V_m de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" observée lorsque la concentration de ces cations varie, doit permettre d'analyser le mode d'action de Na^+ et K^+ aux différents niveaux de la réaction(63)

Dans une première partie, nous proposons un schéma de l'action du sodium au stade de phosphorylation de l'enzyme qui

permet d'écrire une équation de la vitesse initiale d'hydrolyse de l'ATP rendant compte des résultats expérimentaux.

Puis, dans une deuxième partie, les effets du sodium et du potassium sur l'ensemble du système transporteur sont étudiés. Pour cette étude cinétique, les calculs nécessitent l'utilisation d'un certain nombre d'hypothèses, en particulier le choix d'un modèle de transporteur. L'équation obtenue pour la vitesse maximum de l'ATPase " $\text{Mg}^{2+}\text{-Na}^+\text{-K}^+$ dépendante" est comparée aux courbes $V_m=f(\text{Na}^+\text{-K}^+)$ trouvées expérimentalement. Mais, l'existence d'une concordance entre les données théoriques et les données expérimentales ne peut être considérée comme un critère absolu de la validité du schéma utilisé.

1) EFFETS DES CATIONS MONOVALENTS SUR L'ETAPE DE PHOSPHORYLATION DE L'ENZYME

Quelque soit le modèle proposé pour décrire l'action du sodium et du potassium sur l'ATPase " $\text{Mg}^{2+}\text{-Na}^+\text{-K}^+$ dépendante", il est maintenant admis, comme le montrent les expériences d'incorporation de P^{32} dans les membranes, que le sodium est indispensable à la réaction de phosphorylation de l'enzyme (62). Le rôle du potassium à ce stade est lui moins bien connu.

La même méthode d'analyse que celle déjà considérée pour étudier le mode d'action du magnésium et du calcium est utilisée. En effet, nous avons vu que l'étude de la fonction $\frac{K_m}{V_m}$ permet de dissocier les actions des cations monovalents au niveau de l'étape de phosphorylation de l'enzyme, de celles qui existent au niveau de la chaîne transporteuse.

L'intervention du sodium au niveau de la phosphorylation peut être envisagée de deux façons :

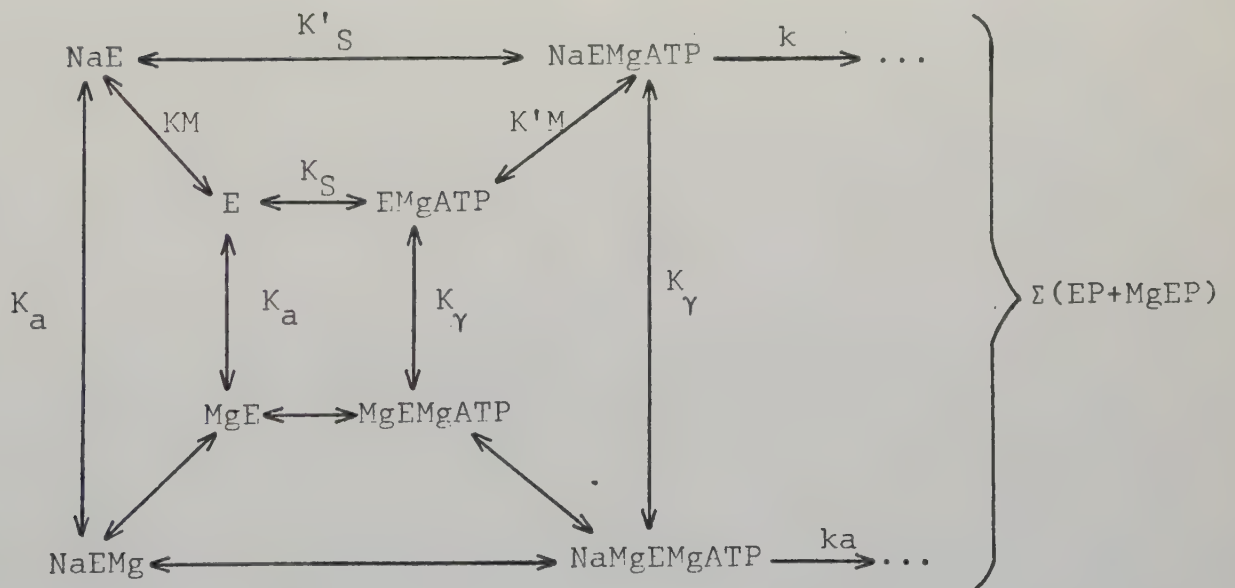
- le sodium peut agir par conversion d'une forme inactive

de l'enzyme en une forme active sans interaction directe avec le substrat :

- il peut agir par formation au niveau du site enzymatique d'un complexe ternaire enzyme-substrat-sodium qui soit le seul permettant l'hydrolyse de l'ATP.

a) Considérons la première hypothèse pour laquelle il existe un site régulateur de l'enzyme.

Le schéma de la phosphorylation de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" à partir de l'hydrolyse de l'ATP peut être représenté de la façon suivante :



Seules les constantes d'équilibre et de dissociation indispensables au calcul sont notées sur le schéma.

Le symbole $\Sigma(\text{EP} + \text{MgEP})$ représente l'ensemble de toutes

les formes phosphorylées.

La nécessité de faire intervenir deux ions magnésium a été montrée lors du précédent chapitre.

Soit S la concentration en complexe MgATP^{2-} .

Le calcul de la vitesse initiale est analogue à ceux déjà réalisés lors de l'étude des effets du magnésium et du calcium.

La vitesse initiale s'écrit toujours :

$$v_i = \frac{V_m S}{K_m + S}$$

et le rapport K_m/V_m peut se mettre sous la forme :

$$(17) \quad \frac{K_m}{V_m} = \frac{a(\text{Na}) + b}{c(\text{Na})}$$

a, b, c sont des constantes fonction des constantes K_i , k_i du système, et des concentrations en magnésium et enzyme total.

Cette analyse théorique nous montre que s'il n'y a pas interaction directe de Na^+ avec MgATP^{2-} , les variations du rapport K_m/V_m décrivent une hyperbole en fonction de la concentration en sodium.

Une série d'expériences est donc réalisée sur des membranes de globules rouges. La vitesse initiale de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" est mesurée successivement aux concentrations en ATP égales à 12-24-48 $\mu\text{M/l}$ pour des concentrations en sodium de 2-5-10-30-80 mM/l . Les milieux réactionnels contiennent :
Tris : 10 mM/l - Cystéine : 2 mM/l - Mg^{2+} libre : 50 $\mu\text{M/l}$ -
 K^+ : 1 mM/l - pH : 8 - membranes en protéines selon Lowry 0,4 mg/ml

La force ionique est maintenue constante en remplaçant le sodium par de la choline. La concentration en substrat MgATP^{2-} est calculée à partir de la constante d'équilibre K_0 app., dont les valeurs numériques varient de $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ à $2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ lorsque les concentrations en cations monovalents augmentent de 0 à 80mM/l.

K_m et V_m sont déterminés à partir des courbes $v_i = f(\text{MgATP}^{2-})$ tracées en coordonnées Lineweaver-Burk.

Les variations obtenues du rapport $\frac{K_m}{V_m}$ sont représentées sur la figure 11. Leur existence confirme la nécessité de l'intervention du sodium au niveau de l'étape de phosphorylation, mais pour des concentrations en sodium supérieures à 15mM/l, la courbe expérimentale ne peut s'identifier à la fonction $\frac{a(\text{Na})+b}{c(\text{Na})}$ imposée par le modèle réactionnel choisi.

b) Considérons maintenant le cas où le sodium forme un complexe avec MgATP^{2-} au niveau du site enzymatique. Nous représenterons alors l'étape de phosphorylation par le schéma général ci-dessous, dans lequel :

- le substrat réel de l'ATPase " $\text{Mg}^{2+}\text{-Na}^+\text{-K}^+$ dépendante" est le complexe NaMgATP^- ,
- Na^+ et MgATP^{2-} peuvent se fixer directement sur le site enzymatique,
- K^+ peut entrer en compétition avec Na^+ sur l'enzyme et le substrat en formant les complexes E-K , K-Mg-ATP^- et E-K-Mg-ATP .

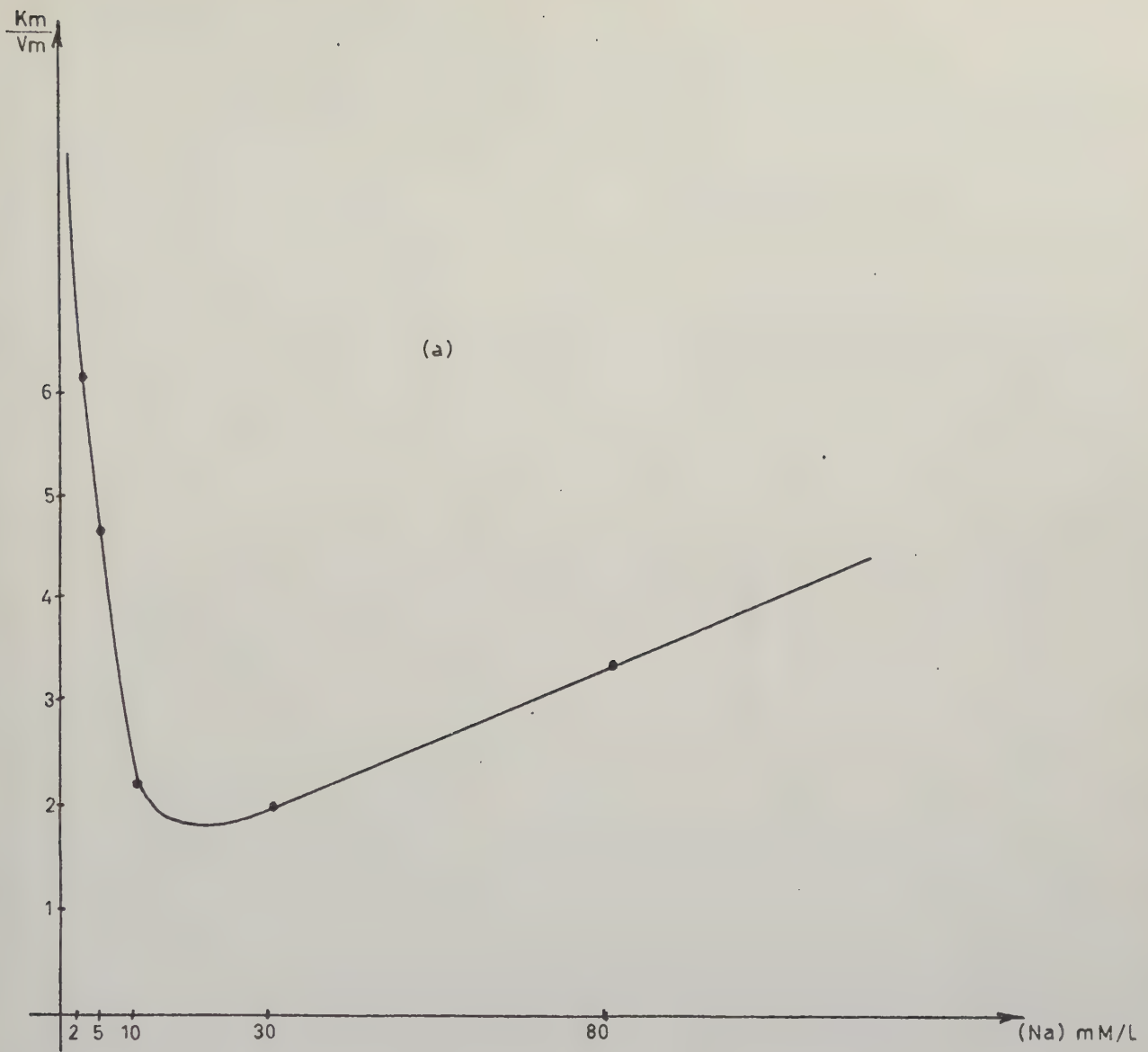
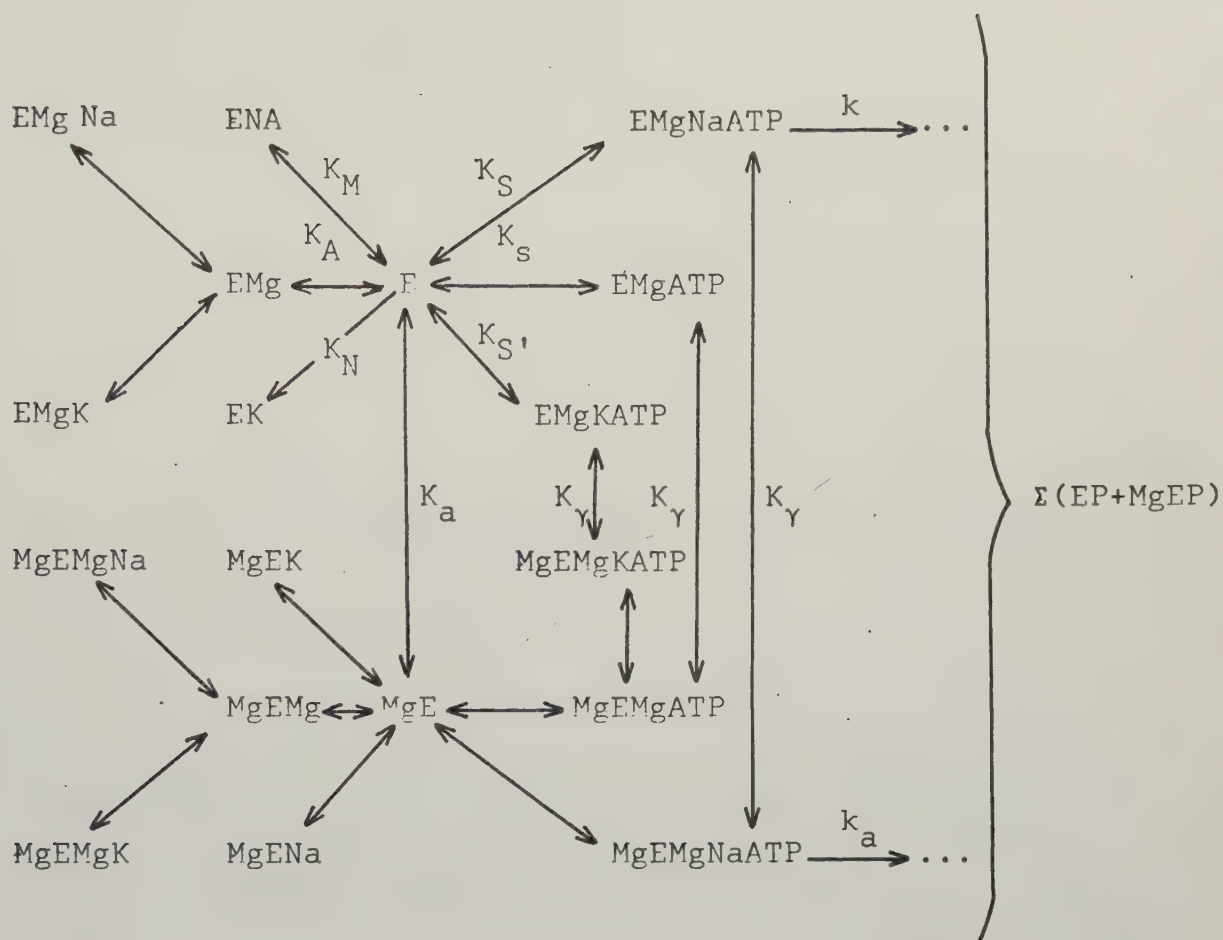


Fig.11 - K_m et V_m sont déterminées en coordonnées Lineweaver-Burk à partir des courbes $v_i = f(MgATP^{2-})$.



Les constantes d'équilibre des chélats que MgATP^{2-} peut former avec les cations Na^+ et K^+ sont définies par les rapports suivants :

$$\frac{\text{MgATP}^{2-} \cdot \text{Na}^+}{\text{Mg Na ATP}^-} = K_1$$

$$\frac{\text{MgATP}^{2-} \cdot \text{K}^+}{\text{MgKATP}^-} = K_2$$

K_M et K_N représentent les constantes d'équilibre de l'enzyme avec le sodium et le potassium libre.

L'équation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en MgATP^{2-} total, c'est-à-dire la somme des concentrations en MgATP^{2-} , NaMgATP^- , KMgATP^- , permet d'écrire le rapport $\frac{K_m}{V_m}$ sous la forme :

$$(18) \quad \frac{K_m}{V_m} = C \left| 1 + \frac{(Na^+)}{K_M} + \frac{(K^+)}{K_N} \right| \left| 1 + \frac{K_1}{(Na^+)} \left(1 + \frac{(K^+)}{K_2} \right) \right|, \text{ où}$$

$$C = \frac{K_S \left(1 + \frac{(Mg^{2+})}{K_A} \right) \left(1 + \frac{(Mg^{2+})}{K_a} \right)}{E_T \left(k + k_a \frac{(Mg^{2+})}{K_Y} \right)}$$

Pour une concentration en potassium constante, et une concentration en sodium variable, l'équation (18) s'écrit :

$$\frac{K_m}{V_m} = \frac{a(Na^+) + b}{C(Na^+)} \left| (Na^+) + d \right|$$

A partir de cette équation, il est possible à l'aide d'une calculatrice et pour un choix de constantes a, b, c, d judicieux, d'obtenir une courbe théorique qui passe par l'ensemble des points expérimentaux de la figure 11. Malheureusement, il n'est pas possible à partir des valeurs numériques a, b, c, d de remonter jusqu'aux constantes K_i , k_i de l'équation (18).

L'augmentation du rapport $\frac{K_m}{V_m}$ retrouvée sur la figure 11 pour les fortes concentrations en sodium est liée à une inhibition de l'enzyme. Dans le cadre des enzymes à métal activateur, cela implique l'existence d'un complexe substrat-métal et une compétition entre celui-ci et l'excès de métal libre.

Le substrat réel de la réaction étant le complexe $NaMgATP^-$, il est possible de déduire l'équation du rapport $\frac{K_m}{V_m}$ correspondant à l'équation $v_i = f((NaMgATP^-))$ à partir de l'équation 18, compte tenu de la relation :

$$(19) \quad |MgATP^{2-} \text{ total}| = |NaMgATP^-| \left| 1 + \frac{K_1}{(Na^+)} + \frac{K_1}{(Na^+)} \cdot \frac{(K^+)}{K_2} \right|$$

Le rapport $\frac{K_m}{V_m}$ s'écrit alors :

$$(20) \quad \frac{K_m}{V_m} = C \left| 1 + \frac{(Na^+)}{K_M} + \frac{(K^+)}{K_N} \right|$$

Lorsque la concentration en sodium est prise comme seule variable, l'équation de K_m/V_m est donc une droite.

Pour comparer ce résultat aux données expérimentales, il nous faudrait utiliser les mesures faites aux différents ATP sous la forme d'une série de courbes $v_i = f(NaMgATP^-)$. Cela nous permettrait d'obtenir un nouveau graphe des variations expérimentales $\frac{K_m}{V_m}$ en fonction de la concentration en sodium. En réalité, il suffit de diviser les ordonnées des points expérimentaux portés sur la figure 11 par la quantité correspondante :

$$1 + \frac{K_1}{(Na^+)} \left| \left(1 + \frac{(K^+)}{K_2} \right) \right|$$

Les constantes K_1 et K_2 de cette expression sont aussi déterminées à l'aide du système luciférine-luciférase. En effet, les complexes $MgATP^{2-}$, $NaMgATP^-$, $KMgATP^-$ sont tous trois des substrats de la réaction de bioluminescence, mais les constantes d'équilibre et/ou de vitesse sont différentes. La fonction $\frac{K_m}{V_m}$ correspondant à cette réaction tracée en fonction de la concentration en sodium ou en fonction de la concentration en potassium est une hyperbole dont la courbure dépend des constantes K_1 ou K_2 (64), ce qui permet de déduire leurs valeurs numériques qui sont identiques et égales à $20 \pm 4 \cdot 10^{-3} M$.

Le nouveau graphe obtenu pour les variations expérimentales de $\frac{K_m}{V_m}$ est une droite (figure 12), ce qui correspond bien à l'équation (20).

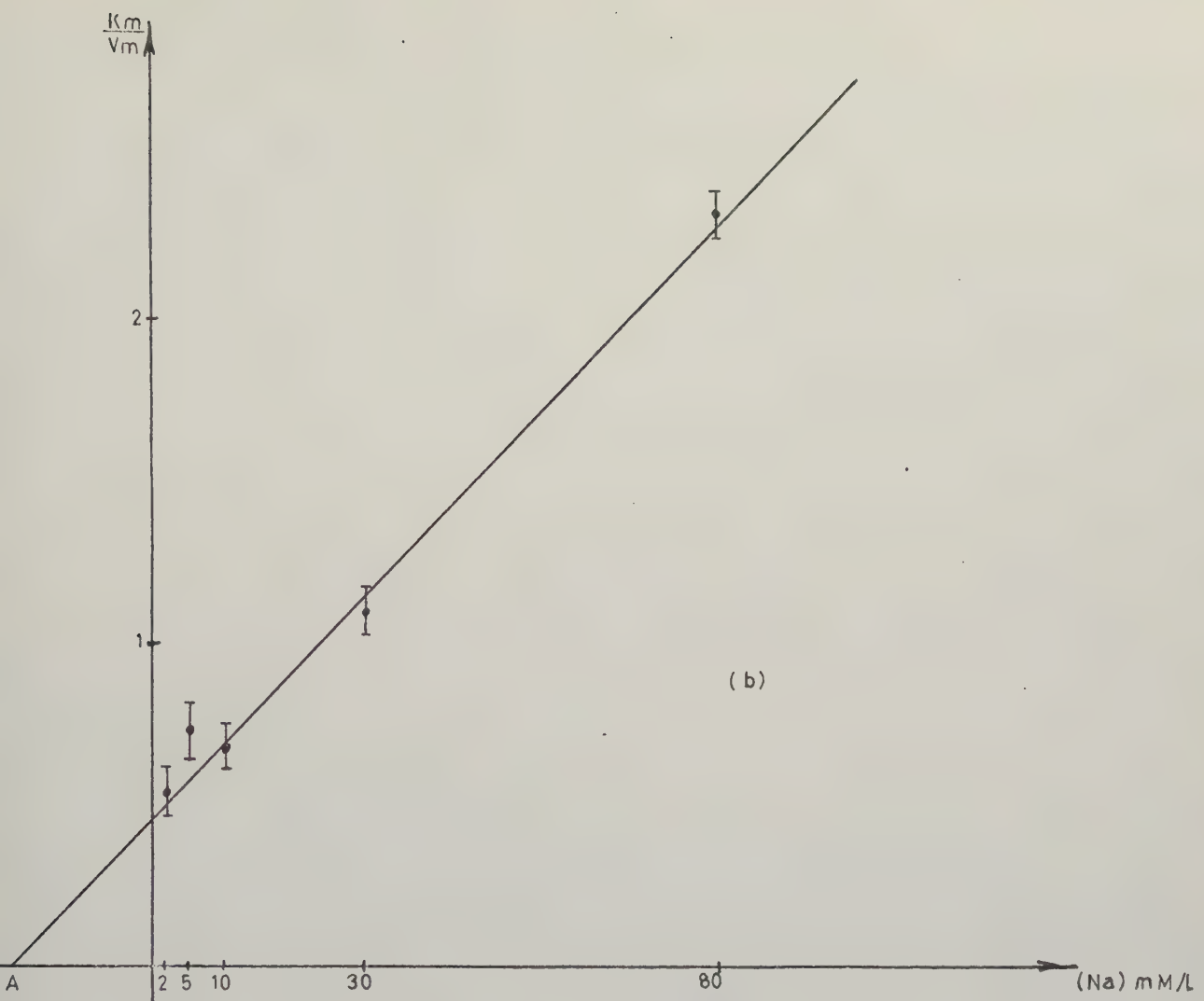


Fig. 12 - K_m et V_m sont déterminées en coordonnées Lineweaver-Burk à partir des courbes $v_i = f(\text{NaMgATP}^-)$.

Pour analyser la compétition qui existe entre Na^+ et K^+ au stade de la phosphorylation de l'enzyme, les variations du rapport K_m/V_m sont étudiées à sodium constant 30mM/l en fonction de la concentration en potassium qui prend les valeurs 1-3-9-15 mM/l. A l'exception des deux cations monovalents, les milieux réactionnels sont identiques à ceux déjà utilisés pour les expériences en fonction du sodium. Pour chaque valeur du potassium, la concentration en complexe NaMgATP^- est calculée par la formule (19), ce qui permet de tracer les courbes $v_i = f(\text{NaMgATP}^-)$. A partir de celles-ci, les paramètres cinétiques sont déterminés et les variations de $\frac{K_m}{V_m}$ sont représentées sur la figure 13. La distribution des points expérimentaux est linéaire et peut donc être représentée par l'équation (20). La pente de la droite tracée est faible ; cela montre que la constante K_N est grande devant les concentrations en ions utilisées. Il doit alors en être de même pour la constante K_S , constante d'association entre l'enzyme et le complexe KMgATP^- . Ainsi, la seule compétition qui existe entre les deux ions à ce stade se fait sur le substrat. Cela est en accord avec la grande spécificité de l'ATPase pour le sodium.

Dans ces conditions, le rapport $(\text{K}^+)/K_N$ est faible et l'abscisse du point A de la figure 12 correspond à $-\text{K}_M$, ce qui permet d'avoir une valeur expérimentale de cette constante.

Ces résultats sont donc en accord avec les hypothèses faites quant aux complexes des cations monovalents avec MgATP^{2-} . On pourrait se demander alors si l'existence de ces complexes ne perturbe pas l'activité de l'ATPase " Mg^{2+} dépendante" mesurée, puisque l'enzyme est alors en présence de trois formes du substrat : MgATP^{2-} , NaMgATP^- , KMgATP^- . Il semble cependant que le comportement de ces trois chélats vis à vis de l'enzyme soit identique puisque des mesures faites sur celui-ci en présence de concentration en potassium élevée (80mM/l), donc à des concen-

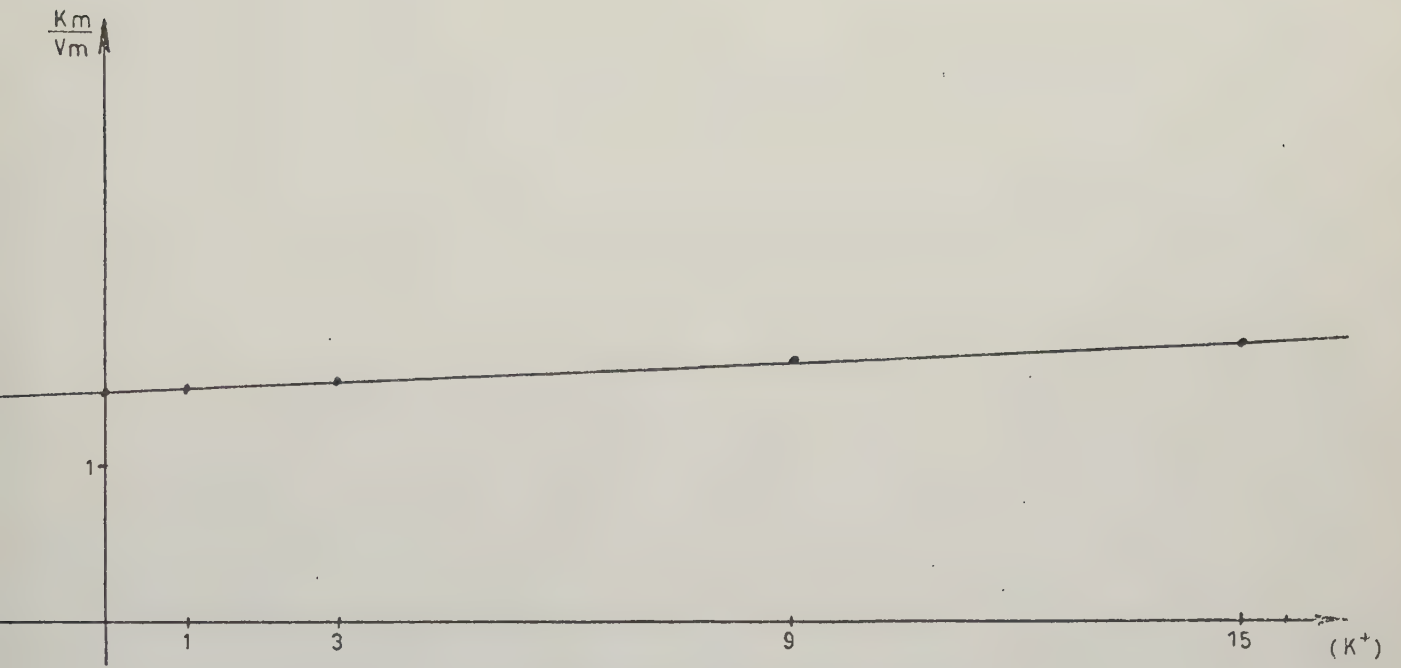


Fig.13 - Le rapport $\frac{K_m}{V_m}$ est déterminé à partir des courbes $v_i = f(NaMgATP^-)$.

trations notables de KMgATP^- , montrent que la vitesse initiale d'hydrolyse de l'ATP n'est pas différente de celles obtenues dans un milieu ne contenant pas de cation monovalent, la force ionique étant maintenue constante par de la choline.

2) INTERVENTION DU SODIUM ET DU POTASSIUM AU NIVEAU DU SYSTEME TRANSPORTEUR

L'activité de l'ATPase " $\text{Mg}^{2+}\text{-Na}^+\text{-K}^+$ dépendante" est modulée par le système transporteur, et il existe ainsi une action indirecte des ions Na^+ et K^+ sur l'enzyme. Selon le type d'intervention avec les sites transporteurs envisagé pour ces cations, différentes équations peuvent être écrites pour la vitesse initiale d'hydrolyse de l'ATP. Les fonctions $V_m = f(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ que l'on en déduit peuvent être comparées aux variations expérimentales obtenues pour ce paramètre cinétique lorsque les concentrations en cations monovalents varient(65)

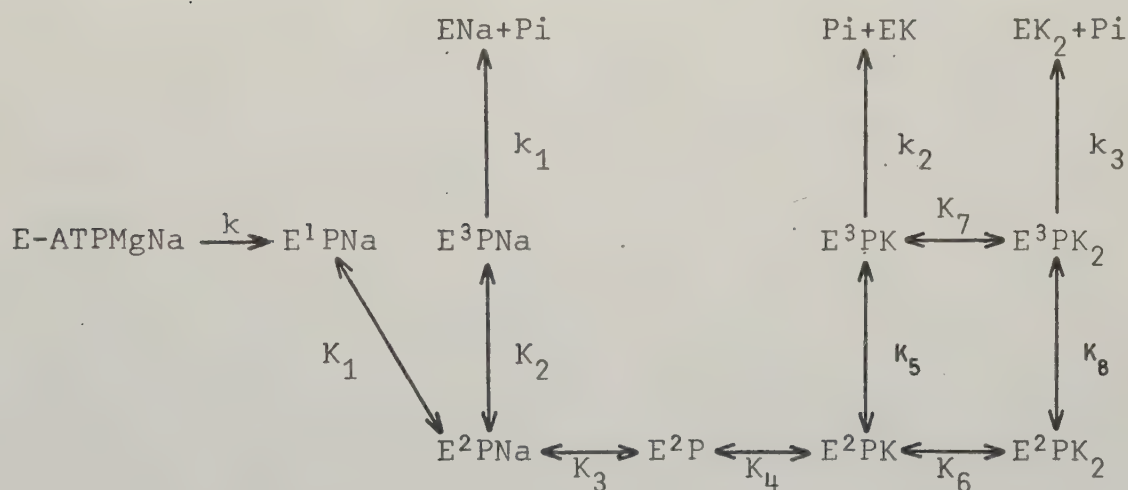
Les hypothèses qu'il est possible de faire sur les interactions du sodium et du potassium avec le système transporteur doivent tenir compte d'un certain nombre de résultats expérimentaux généralement admis :

- En présence de sodium (50mM/l) et aux fortes concentrations en ATP, le potassium active fortement la déphosphorylation de l'enzyme ; aux faibles substrats, l'ATPase " $\text{Mg}^{2+}\text{-Na}^+\text{-K}^+$ dépendante" possède une activité identique en présence ou en absence de ce cation (66). Le sodium doit donc le remplacer pour cette étape de la réaction.

- Le site de transport du potassium de l'extérieur vers l'intérieur de la membrane n'est pas absolument spécifique, puisque dans le phénomène "d'échange diffusion" du sodium, on suppose que ce cation prend la place du potassium sur le transporteur (67).

Parmi les différents modèles que nous avons envisagés pour rendre compte du comportement cinétique de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante", le schéma suivant suffit, comme nous l'écrivons ci-dessous, pour résumer la série des transitions entre les différents états de l'enzyme phosphorylé qui conduisent au transfert des cations.

Face interne de la membrane



Face externe de la membrane

A partir du complexe actif Mg-E-NaMgATP , une chaîne de réactions analogues peut être écrite avec des constantes primées. Ces deux chaînes succèdent à celles représentées dans le schéma précédent.

Un équilibre entre les formes de l'enzyme E^1PNa et $\text{E}^1\text{P+Na}$ n'est pas défini dans le schéma ci-dessus, car on suppose que, lors de la phosphorylation, un changement de structure du site transporteur bloque le sodium qui a participé à la réaction.

Pour expliquer le transfert du cation Na^+ , on admet actuellement qu'il existe une conversion de l'enzyme de l'état

E^1PNa à l'état E^2PNa (68). Le résidu phosphorylé ainsi que Na^+ sont alors orientés vers l'extérieur, et un changement de structure du site transporteur permet la libération de ce cation. Deux autres sodium peuvent également intervenir dans cette série de transitions, puisque dans les conditions physiologiques, trois ions sont transférés de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane lors de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP.

Sur la face externe de la membrane, il y a échange entre Na^+ et K^+ et les différents équilibres qui s'établissent sont favorables à la formation de complexes avec ce dernier cation. Deux ions K^+ peuvent se fixer sur le site transporteur, comme le montre la stoechiométrie de la pompe. L'influx actif de potassium s'explique par une transition de E^2P en E^3P , le radical phosphorylé ainsi que l'ion K^+ étant tourné vers l'intérieur. Cependant, la pompe fonctionnant en présence de sodium comme seul cation monovalent, il faut admettre que cette conversion entre les deux états de l'enzyme peut se faire si E^2P a fixé du sodium. Une déphosphorylation de l'état E^3P aboutit à la libération du phosphate inorganique.

Pour expliquer les variations expérimentales de la vitesse maximum, il n'est pas nécessaire d'utiliser toutes ces données, et le schéma proposé ne tient compte que des points suivants :

- un seul ion Na^+ joue un rôle actif dans les transitions qui existent entre les états de l'enzyme phosphorylé, et lors de la déphosphorylation de E^3PNa ; on admet qu'il s'agit de celui ayant permis la phosphorylation de l'enzyme. Les deux autres sodium peuvent cependant entrer en compétition avec le potassium sur E^2P .

- la vitesse de déphosphorylation de l'état E^3P est différente selon qu'un seul ou deux ions K^+ sont fixés sur le site.

Déterminons l'équation de la vitesse maximum apparente. Les calculs sont faits en considérant que le système est à l'état d'équilibre. On pourrait également envisager un "steady state" où la circulation de l'enzyme de l'état E_1 à l'état E_3 n'est plus négligeable. La forme des équations obtenues étant analogue dans les deux cas, nous avons utilisé la première approximation.

Soit S la concentration en complexe (NaMgATP^-).

La vitesse initiale d'hydrolyse de l'ATP doit aussi tenir compte de la deuxième chaîne de réactions définie dans le texte.

$$v_i = v_1 + v_2 = k \text{ ES} + k_a \text{ Mg ES}$$

$$v_1 = k_1 \text{ E}^3\text{PNa} + k_2 \text{ E}^3\text{PK} + k_3 \text{ E}^3\text{PK}_2$$

$$v_1 = \text{E}^2\text{P} \left| \frac{k_1 k_2}{K_3} (\text{Na}^+) + \frac{k_2 k_5}{K_4} (\text{K}^+) + \frac{k_3 K_8}{K_4 K_6} (\text{K}^+)^2 \right| = P \text{ E}^2\text{P}$$

où p est de la forme :

$$P = A(\text{Na}^+) + B(\text{K}^+) + C(\text{K}^+)^2$$

On obtient de la même façon :

$$v_2 = P' \text{ E}^2\text{P Mg}$$

Si on définit une constante d'équilibre K_δ entre E^2P et E^2PMg , il vient :

$$v_i = v_1 + v_2 = \text{E}^2\text{P} \left(P + P' \frac{\text{Mg}}{K_\delta} \right) = \text{ES} \left(k + k_a \frac{\text{Mg}}{K_\delta} \right)$$

En définissant ΣEP comme la somme de toutes les formes E^1P , E^2P , E^3P , on peut écrire :

$$\Sigma EP = E^2P \left[1 + (1 + K_2 + \frac{1}{K_1}) \frac{(Na^+)}{K_3} + (1 + K_5) \frac{(K^+)}{K_4} + (1 + K_8) \frac{(K^+)^2}{K_4 K_6} \right]$$

$\Sigma EP = q E^2P$, où q est de la forme :

$$q = 1 + D(Na^+) + E(K^+) + F(K^+)^2$$

De même, nous avons : $\Sigma MgEP = q' MgE^2P$

$$D'où : \Sigma (EP + MgEP) = \frac{ES}{P + P'} \frac{Mg}{K_\delta} (k + k_a \frac{Mg}{K_\gamma}) (q + q' \frac{Mg}{K_\delta})$$

$$\Sigma (EP + MgEP) = ES.f \left[(Na^+), (K^+) \right]$$

Considérons à nouveau la vitesse initiale :

$$v_i = \frac{E \cdot S}{K_S} (k + k_a \frac{Mg}{K_\gamma})$$

Exprimons la concentration en enzyme libre par rapport à celle de l'enzyme total.

$$E_T = E \left[\frac{S}{K_S} \left(f(Na^+ - K^+) + (1 + \frac{Mg}{K_\gamma}) \left(1 + \frac{K'_1 K_S}{K_S Na^+} + \frac{K'_1 K_S (K^+)}{K'_2 K_S (Na^+)} \right) \right) + (1 + \frac{Mg}{K_A}) (1 + \frac{Mg}{K_a}) \left(1 + \frac{(Na^+)}{K_M} + \frac{(K^+)}{K_N} \right) \right]$$

La vitesse initiale s'écrit alors :

$$v_i = \frac{E_T S (k + k_a \frac{Mg}{K_\gamma})}{S \left[f(Na^+ - K^+) + (1 + \frac{Mg}{K_\gamma}) \left(1 + \frac{K'_1 K_S}{K_S Na^+} + \frac{K'_1 K_S (K^+)}{K'_2 K_S (Na^+)} \right) \right] + K_S (1 + \frac{Mg}{K_A}) (1 + \frac{Mg}{K_a}) \left(1 + \frac{(Na^+)}{K_M} + \frac{(K^+)}{K_N} \right)}$$

équation qui peut se mettre sous la forme :

$$v_i = \frac{V_m \cdot S}{K_m + S}$$

En remplaçant $f(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ par son expression, l'équation de V_m devient :

$$V_m = \frac{E_T (k+k_a \frac{Mg}{K_Y}) (p+p' \frac{Mg}{K_\delta})}{(q+q' \frac{Mg}{K_S})(k+k_a \frac{Mg}{K_Y}) + (1+\frac{Mg}{K_Y}) \left[1 + \frac{K'_1 K_S}{K_S \text{Na}^+} + \frac{K'_1 K_S (K^+)}{K'_2 K_{S'} (\text{Na}^+)} \right] (p+p' \frac{Mg}{K_\delta})}$$

Nous négligerons le terme $\frac{K_S K'_1 (K^+)}{K'_2 K_{S'} (\text{Na}^+)}$, compte tenu de la valeur de la constante $K_{S'}$.

En remplaçant p, p', q, q' par leur équation en fonction de la concentration en Na^+ et K^+ , l'équation de la V_m est la suivante :

$$21) V_m = \frac{E_T [a(\text{Na}^+) + b(K^+) + c(K^+)^2]}{(1 + \frac{K'_1 K_S}{K_S (\text{Na}^+)}) [d(\text{Na}^+) + e(K^+) + f(K^+)^2] + g(\text{Na}^+) + h(K^+) + i(K^+)^2 + j}$$

REMARQUE

Nous avons supposé que l'ion Na^+ ayant permis la phosphorylation joue un rôle sur le plan cinétique ; la compétition qui peut exister entre le potassium et les deux autres sodium sur la face externe de la membrane a été négligée. Dans le cas contraire, cela revient dans le calcul à remplacer la constante K_4 du schéma par un polynome du deuxième degré en Na^+ , ce qui dans l'équation de V_m ne change pas les termes en K^+ et $(\text{K}^+)^2$, mais fait apparaître des termes en Na^+ d'un degré supérieur. Les limites imposées par la méthode expérimentale ne permettent pas d'en discuter l'existence et c'est l'équation simplifiée qui est utilisée dans le texte.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les figures 14 et 15 rapportent les variations expérimentales de la vitesse maximum de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" obtenues lorsque les concentrations en Na^+ ou K^+ varient. L'allure de ces courbes peut être retrouvée parmi les graphes qu'il est possible de tracer à partir de l'équation (21). Cette analogie avec les résultats expérimentaux rend probable les hypothèses faites quant à l'importance relative pour la cinétique de la réaction, des différentes interactions de Na^+ et de K^+ avec les sites transporteurs. Ainsi, un sodium et deux potassium en se fixant sur l'enzyme phosphorylé permettent des transitions entre différentes formes de celui-ci et la déphosphorylation de l'une d'entre elles. On peut donc concevoir que ces cations apparaissent comme des effecteurs allostériques de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante". D'ailleurs, la forme de la courbe $V_m=f(\text{K}^+)$ de la figure 14 est analogue aux variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en potassium obtenue par certains auteurs pour de fortes concentrations en ATP (69)(70). L'allure sigmoïdale de ces courbes est interprétée par ceux-ci comme le résultat d'une interaction coopérative entre deux ou plusieurs sites et le ligand. Cependant, comme l'écrit WHITTAM (71), la compétition qui existe entre Na^+ et K^+ à l'extérieur de la membrane sur le site transporteur suffit pour rendre compte de la réponse sigmoïdale de la pompe lorsque la concentration en potassium externe augmente. D'autre part, comme la seule intervention d'un sodium et de deux potassium sur les sites transporteurs permettent d'expliquer le comportement de l'enzyme, il ne semble plus nécessaire d'invoquer la présence sur l'ATPase de sites régulateurs différents des sites de transfert.

Enfin, si parmi les modèles de pompe à sodium, on choisit celui où le transport s'effectue par l'intermédiaire de petites molécules phosphorylées par l'ATPase, puis diffusant à travers

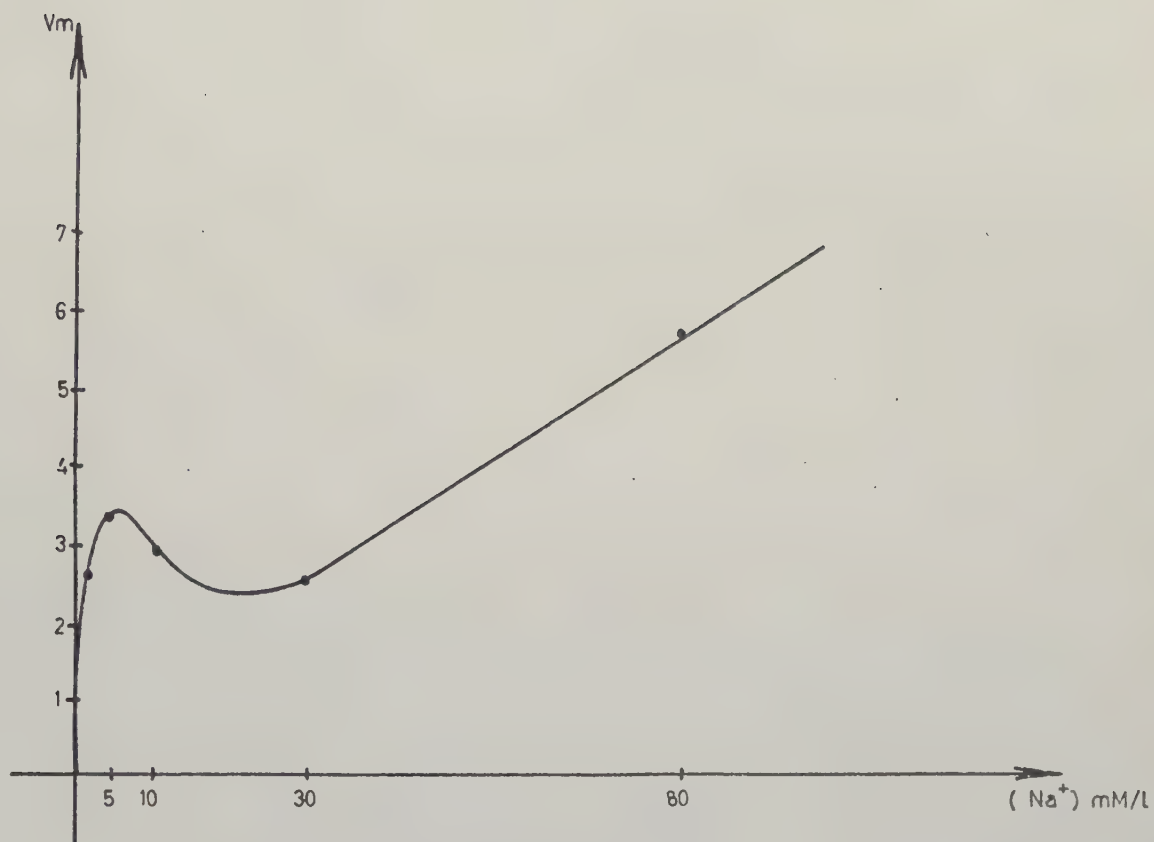


Fig.14 - Les milieux réactionnels correspondent à ceux de la figure 11.

V_m est exprimée en μMATP hydrolysés/mn./mg de protéines.

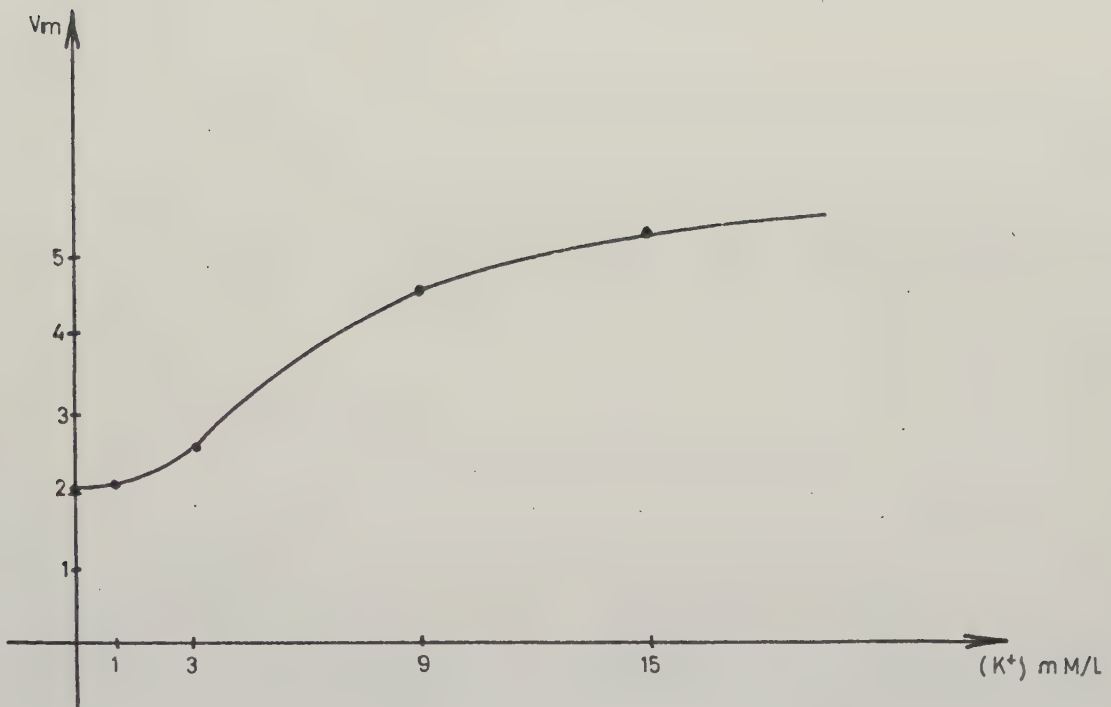


Fig. 15 - Les milieux reactionnels correspondent à ceux de la figure 13.
 V_m est exprimée en $\mu\text{M ATP hydrolysées/mn/mg de protéines}$.

la membrane, il est possible d'écrire une équation de V_m analogue à l'équation (21), si les mêmes conditions sont imposées sur les sites où se fixent les ions. Il faut parler alors d'un comportement pseudo-allostérique de l'ensemble ATPase-chaîne transporteuse, l'enzyme lui-même étant michaelien.

La méthode utilisée ne permet donc pas de choisir un modèle de transport actif, mais elle permet de connaître les contraintes qu'imposent sur le plan cinétique les interactions du sodium et du potassium avec les sites transporteurs.

TROISIEME PARTIE

SOLUBILISATION DES MEMBRANES A L'AIDE
DU DETERGENT ANIONIQUE LE "LUBROL WX"

Les résultats des études cinétiques que nous avons réalisées n'apportent des informations que sur les interactions ions-sites, mais ne permettent pas d'analyser les différentes parties du système transporteur. Il est donc nécessaire d'utiliser d'autres voies de recherches dont les plus intéressantes font intervenir des préparations de membranes solubilisées.

La solubilisation des membranes peut être envisagée de deux façons différentes :

- solubilisation totale de la membrane en vue d'une analyse de ses différents constituants, mais la destruction de l'organisation moléculaire entraîne une disparition de l'activité ATPasique. Cependant, il est possible de réaliser sur les membranes intactes un marquage spécifique par l'ATP³² ou la ouabaïne tritiée, et une solubilisation de ces membranes avec essai de séparation des composés marqués peut permettre l'identification d'un intermédiaire du système transporteur.

- solubilisation partielle avec conservation de l'activité enzymatique. Dans ce cas, obtenu seulement pour un petit nombre d'agents solubilisants, l'intégrité du complexe ATPase-système transporteur semble respectée. Des procédés de chromatographie ou des centrifugations zonales réalisées avec ces solubilisations doivent permettre d'obtenir une purification partielle de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante".

C'est la raison pour laquelle nous nous sommes intéressés aux différents procédés de solubilisation partielle des membranes de globules rouges.

Les agents les plus utilisés sont les détergents non ioniques, tels que le Triton X100 (72) et le Lubrol wx (73), les détergents anioniques comme le sodium dodecyl sulfate (74), et enfin le désoxycholate de sodium (75). L'incubation, sous certaines conditions, d'un matériel membranaire avec l'un de ces détergents conduit à une augmentation de l'activité spécifique (activité/mg de protéines) de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante". Cette activation n'existe que pour un certain domaine de concentration en détergents, des concentrations supérieures à 1% inactivant quasi totalement l'enzyme. La concentration optima pour obtenir une préparation solubilisée ayant conservé son activité enzymatique semble être celle juste nécessaire à la formation de micelles. JORGENSEN et SKOU (76) après une étude comparée portant sur l'influence des détergents quant à l'activité " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" d'une préparation de reins de lapins écrivait : "L'aspect important de l'action des molécules de détergents est le départ des protéines et des lipides de la membrane, et non la pénétration des molécules de détergents dans la structure de la membrane".

Mais, si l'activation de l'activité spécifique est retrouvée par beaucoup d'auteurs, il n'en reste pas moins qu'il existe la plupart du temps une diminution importante de l'activité ATPasique totale, surtout si Na^+ et ATP sont absents du milieu de solubilisation. Or, l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" des érythrocytes humains ayant une activité très faible par rapport à celle d'autres tissus, ces solubilisations conduisent généralement à une préparation enzymatique trop peu active pour mener à bien des expériences. Pourtant, les membranes de globules rouges en tant que matériel d'étude offrent des avantages. En effet, les cellules de la plupart des tissus ainsi que certains organismes cellulaires contiennent une ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante"

membranaire. L'étude d'une "ATPase de transport" suppose donc que l'on sépare la membrane cellulaire de son contenu cytoplasmique. Dans le cas des cellules contenant des organites qui possèdent une ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante", la séparation doit être fine et une contamination de la préparation est toujours possible. Avec des érythrocytes, au contraire, ce risque n'existe pas, car on utilise des cellules relativement simplifiées dont la seule ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" est localisée dans la membrane.

Nous rapportons dans ce chapitre un procédé de solubilisation à l'aide de lubrol wx qui permet d'extraire à peu près toute l'activité ATPasique totale des membranes initiales. Le lubrol est utilisé, car parmi tous les détergents que nous avons essayés, seul ce dernier aux faibles concentrations n'inhibe pas le système luciférine-luciférase employé pour la détermination de la vitesse initiale d'hydrolyse de l'ATP. Or, cette méthode nous semble très précieuse pour réaliser des études cinétiques.

Le procédé de solubilisation adopté est le suivant :

- un volume v de membranes d'érythrocytes humains est mélangé à 4°C avec le même volume v d'un milieu de solubilisation pH 7,5 dont la composition est définie ci-dessous :

. Imidazole	: 2,5 mM/l
. Maléate	: 2,5 mM/l
. Dithiothreitol	: 0,5 mM/l
. Glycérol	: 40 %
. Lubrol	: 0,4 %

- le mélange est laissé 20 minutes à 4°C , puis centrifugé une heure à 100.000 g (OMEGA II-CHRIST). Le surnageant est recueilli et constitue la préparation solubilisée sur laquelle sera mesurée l'activité ATPasique.

Le dithiothreitol employé pour préserver les groupes SH semble avoir une action beaucoup plus importante que celle de la cystéine, quant à la stabilité de l'activité enzymatique des solubilisations (77).

Une inhibition de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" par le glycérol en présence de potassium a été décrite (78), mais nos milieux de solubilisation ne contiennent pas de métaux alcalins.

1) Comparaison des activités ATPasiques d'une préparation de fragments de membranes et d'une préparation solubilisée.

Une partie seulement d'une suspension de membranes est solubilisée selon les conditions précédemment décrites et le même jour, des mesures de vitesse initiale d'hydrolyse de l'ATP sont effectuées sur les deux préparations : membranes diluées au demi et membranes solubilisées.

Les deux milieux réactionnels utilisés sont :

- Tris 10mM/l - Cystéine 2mM/l - Mg^{2+} 50 μ M/l - Na^+ 70mM/l - K^+ 10mM/l - pH=8.
- Tris 10mM/l - Cystéine 2mM/l - Mg^{2+} 50 μ M/l - Choline 80mM/l - pH=8.

Les cinétiques de l'hydrolyse de l'ATP sont présentées sur les figures 16 et 17. Les constantes de Michaelis et les vitesses maximum apparentes que l'on peut en déduire sont les suivantes :

		Km	Vm
- Membranes	ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante"	16,6	10
	ATPase " Mg^{2+} dépendante"	13,8	18,2
- Membranes solubilisées	ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante"	2,14	17,6
	ATPase " Mg^{2+} dépendante"	5,75	7,6

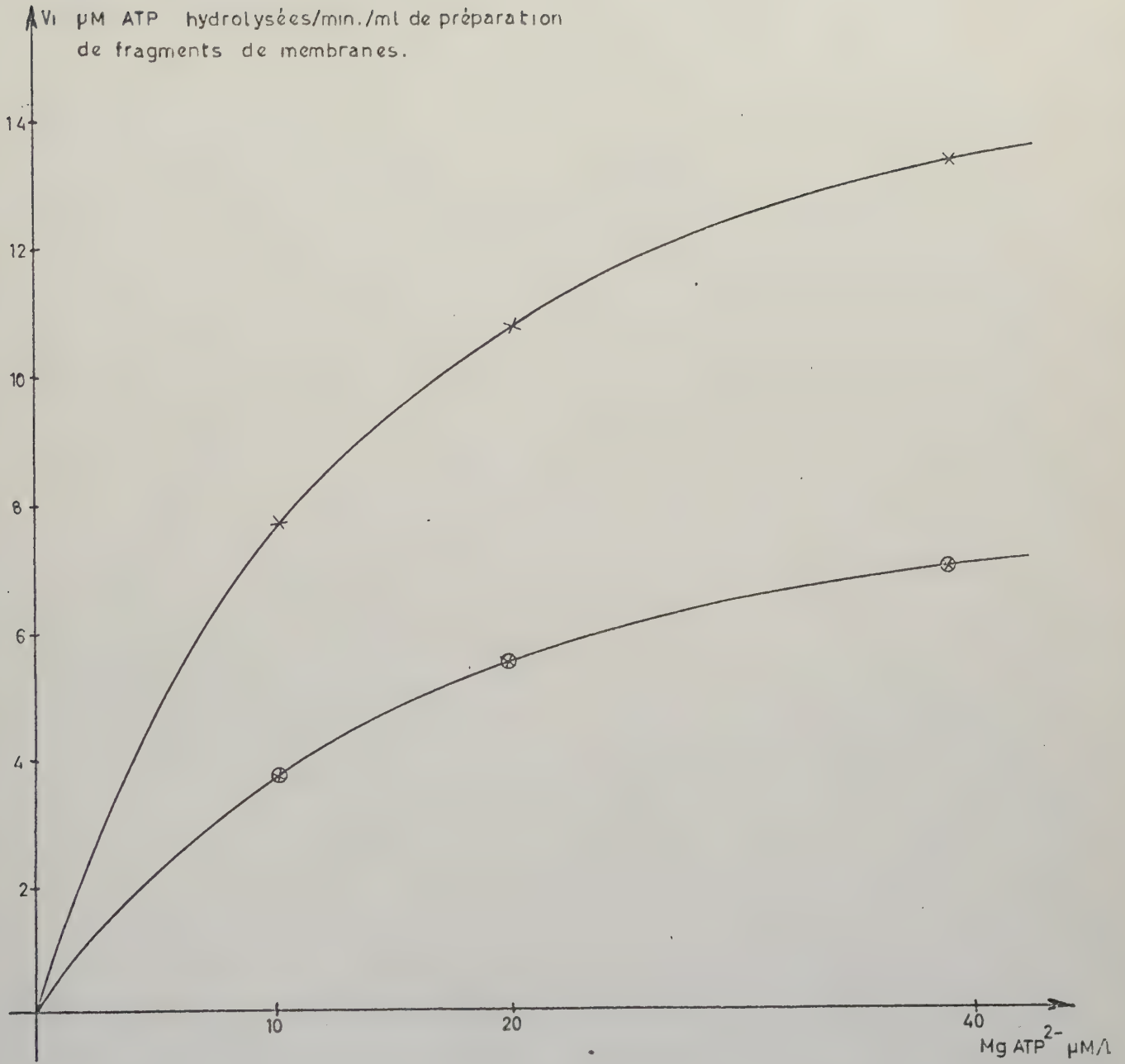


Fig. 16 - Cinétique d'hydrolyse de l'ATP par une préparation de membranes.

× ATPase « Mg^{2+} dépendante »

⊗ ATPase « Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante »

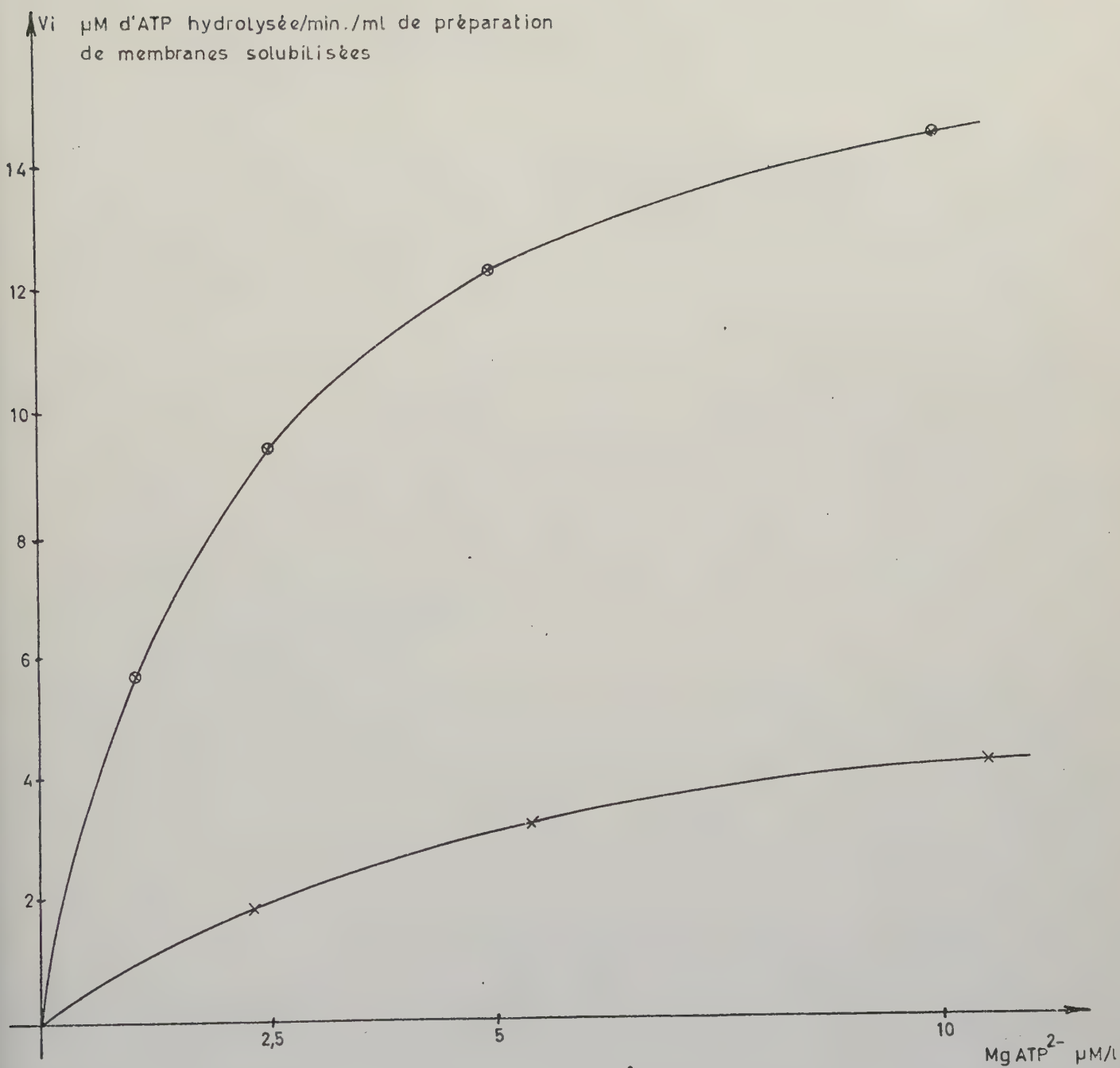


Fig.17 - Cinétique d'hydrolyse de l'ATP par une préparation de membranes solubilisées

$\otimes$ ATPase « Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante »

$\times$ ATPase « Mg^{2+} dépendante »

Les vitesses maximum sont exprimées en μ M d'ATP hydrolysées par minute et par millilitre de préparation, les concentrations en ATP en μ M/l.

Les protéines sont mesurées selon la méthode de LOWRY(79) un millilitre de suspension de membranes contient 4,2mg de protéines, un millilitre de suspension de membranes solubilisées en contient 2,5.

Un certain nombre de remarques peuvent être formulées :

a) Environ 90% de l'activité ATPasique totale est retrouvé dans le surnageant après traitement par le lubrol.

b) Le pourcentage d'ATPase " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante" solubilisée est à peu près de 175%. A l'opposé, la solubilisation apporte une diminution de l'activité " Mg^{2+} dépendante" qui est, dans l'expérience citée, de 58%.

L'activité ATPasique totale n'ayant pas changé, on pourrait concevoir qu'il y a eu conversion de l'ATPase " Mg^{2+} dépendante" en l'enzyme " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante" ; ces résultats pourraient être un nouvel argument en faveur de la théorie proposant que les deux ATPases représentent deux formes d'un même enzyme.

c) Les constantes de Michaelis des deux ATPases relatives à la préparation solubilisée sont très inférieures à celles correspondant à la suspension de membranes initiales. Cela suggère que la solubilisation conduit à une facilitation de l'accès aux sites actifs des ATPases, facilitation qui serait plus importante pour l'ATPase " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante" que pour l'ATPase " Mg^{2+} dépendante".

2) Un autre paramètre étudié est celui du pourcentage des protéines solubilisées.

Activités ATPasiques et pourcentages de protéines solu-

bilisées varient en fonction de la concentration en lubrol utilisée et en fonction du pH du milieu de solubilisation.

Le tableau III correspond à des solubilisations réalisées à pH 7,5 et selon différentes concentrations en lubrol. Les pourcentages d'activité ATPasique ou de protéines solubilisées sont exprimées par rapport à la préparation initiale des fragments de membranes.

Tableau III

	Concentration en Lubrol			
	0,08%	0,2%	0,4%	1%
% Activité ATPasique "Mg ²⁺ -Na ⁺ -K ⁺ dépendante"	0	175	175	100
% Activité ATPasique "Mg ²⁺ dépendante"	0	42	42	5
% de protéines solubilisées	17	38	60	70

Le pourcentage de protéines solubilisées augmentent avec la concentration en lubrol, mais des concentrations supérieures à 0,4% inhibent l'ATPase. Par contre, dans le domaine 0,2%-0,4%, la même activité enzymatique "Na⁺-K⁺ dépendante" est retrouvée en solution, soit environ 175% de la préparation de membranes initiales.

Le tableau IV montre les pourcentages d'activité ATPasique retrouvés en fonction du pH du milieu de solubilisation, celle-ci étant réalisée avec une concentration en lubrol de 0,4%.

Tableau IV

pH du milieu de solubilisation	7	7,5	8	8,5
% Activité ATPasique " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante"	83	175	83	0
% Activité ATPasique " Mg^{2+} dépendante"	42	42	30	0
% de protéines solubilisées	40	60	65	68

La plus forte activité " Na^+ - K^+ dépendante" correspond à un milieu de solubilisation pH 7,5. Si l'on considère maintenant le pourcentage d'extraction des protéines, les conditions pH 7,5 -concentration en lubrol 0,2 %- sont les plus intéressantes. En effet, seulement 38% des protéines sont extraites dans ce cas, contre 60% avec une concentration en lubrol de 0,4%. La plus haute activité spécifique " Na^+ - K^+ dépendante" est donc obtenue avec une concentration en détergent de 0,2 % ; elle atteint 11 μM ATP hydrolysées/minute/mg de protéines, chiffre quatre à cinq fois supérieur à celui trouvé quant à l'ATPase de la préparation témoin.

Ainsi, la solubilisation à l'aide de faibles concentrations en lubrol, outre une activation de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante", offre-t-elle l'avantage d'obtenir une purification partielle de cette enzyme puisque environ 60% du matériel membranaire peut être éliminé. Cependant, comme pour tout essai de purification, il y a fragilisation du système, et la préparation n'est stable à 37°C que pendant 7 à 8 minutes selon les expériences. L'utilisation de la méthode de mesure de la vitesse initiale basée sur le système luciférine-luciférase permet de par sa rapidité l'étude de l'activité enzymatique.

C O N C L U S I O N

:---:---:---:---:---:---:

Ce travail concerne le transport actif des cations à travers les membranes des érythrocytes humains.

Parmi les différents modèles de transport actif qui ont été invoqués le plus probable paraît être celui d'un système enzymatique aboutissant à la formation d'un complexe entre le sodium et une molécule de la membrane.

Dans une première partie, il est montré que pour un tel modèle la cinétique du transfert du sodium peut être décrite par une somme de deux exponentielles. Des mesures d'influx et d'efflux du Na^{22} mettent en évidence une cinétique vérifiant ces équations. Tout se passe donc comme si le transport actif se comportait comme un troisième compartiment virtuel s'ajoutant au cytoplasme et au milieu extérieur.

- Une étude cinétique de l'ATPase " $\text{Mg}^{2+}\text{-Na}^+\text{-K}^+$ dépendante" est ensuite présentée. En effet, quelque soit le modèle de pompe à sodium envisagé, cette enzyme est couplée au système transporteur et les interactions des ions avec celui-ci vont moduler l'activité ATPasique.

Cette analyse, réalisée à des faibles concentrations en substrat, est effectuée à l'aide du système "luciférine-luciférase" qui permet d'évaluer en fonction du temps la variation de

concentration en ATP du milieu réactionnel. Cette méthode conduit à une détermination précise et rapide des différentes vitesses initiales d'hydrolyse.

. Avant d'analyser plus précisément les interactions entre les cations monovalents Na^+ et K^+ et les sites transporteurs, le mode d'action du magnésium sur "l'ATPase de transport" est étudié, ce dernier cation étant indispensable pour la première étape de la séquence des réactions qui conduit à l'hydrolyse de l'ATP.

Le complexe MgATP^{2-} est en réalité le substrat réel de la réaction, mais la vitesse maximum apparente obtenue quand la concentration en magnésium libre diminue ne tend pas vers zéro. Cela exclut une inhibition par excès d'ATP libre. La formation du complexe MgATP^{2-} ou la présence du magnésium sur le site enzymatique est donc indispensable pour que l'ATP se fixe sur l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante". Il y a là probablement un problème de conformation du nucléotide ; la présence de Mg^{2+} sur la molécule doit diminuer son encombrement stérique pour lui permettre de s'adapter au site actif de l'enzyme.

Un schéma réactionnel est alors proposé dans lequel interviennent deux ions Mg^{2+} , l'un nécessaire à la phosphorylation de l'enzyme, l'autre stimulant la déphosphorylation. Les actions du magnésium sur l'étape de phosphorylation sont dissociées de celles qui existent au niveau de la déphosphorylation, grâce à l'analyse du rapport Km/Vm . En effet, les variations de ce rapport ne dépendent pas des interactions qui ont lieu au niveau de la chaîne transporteuse.

Pour expliquer les résultats obtenus quant aux variations de Vm et du rapport Km/Vm , il est nécessaire de considérer que la présence de Mg^{2+} sur le deuxième site de l'enzyme diminue la vitesse de phosphorylation, et que les constantes d'affinité de ce deuxième magnésium avec les trois formes de l'enzyme, enzyme

libre - enzyme-substrat - enzyme phosphorylé, sont différentes.

Le calcium étant décrit comme un antagoniste du magnésium quant à son action sur l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante", nous avons analysé ses interactions avec l'enzyme à partir du schéma proposé pour rendre compte des effets du magnésium. Le complexe CaATP^{2-} apparaît comme un substrat, et le calcium libre entre en compétition avec Mg^{2+} au niveau de la déphosphorylation.

Ce même modèle convient également pour l'ATPase " Mg^{2+} dépendante", puisque le comportement cinétique des enzymes est similaire.

- Le comportement cinétique de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^+ - K^+ dépendante" est ensuite étudié en fonction des concentrations en sodium et potassium. Les résultats obtenus permettent d'envisager que le substrat réel de la réaction est le complexe NaMg-ATP^- . Le sodium impliqué dans ce complexe est fixé lors de la réaction de phosphorylation de l'enzyme sur un site transporteur.

Les variations obtenues pour la vitesse maximum en fonction du sodium ou du potassium montrent que, parmi les différentes interactions qui existent entre ces ions et les sites transporteurs, seules interviennent sur le plan cinétique :

- celle du sodium qui a permis la phosphorylation,
- celles des deux ions potassium qui sont transférés.

Cela suffit pour rendre compte du comportement allostérique de l'enzyme dans un modèle où c'est la macromolécule phosphorylée qui change de structure pour transférer les ions, ou encore du comportement pseudo-allostérique d'un complexe ATPase-chaîne transporteuse dans un modèle où c'est une petite molécule qui permet le transport actif des cations.

- La dernière partie rapporte une méthode de solubilisation des membranes d'érythrocytes humains réalisée à l'aide d'un

détergent non ionique le Lubrol wx. Celui-ci permet aux concentrations employées de solubiliser 90% de l'activité ATPasique totale qui existait initialement dans la préparation des fragments de membranes, tout en extrayant seulement 20% des protéines membranaires. Cette solubilisation entraîne des modifications des paramètres cinétiques des deux ATPases par rapport à ceux présentés par la suspension de membranes ; une diminution des constantes de Michaelis, une augmentation de la vitesse maximum apparente de l'ATPase de transport, et à l'opposé une diminution de celle de l'ATPase " Mg^{2+} dépendante".

Ainsi, la préparation solubilisée obtenue présente une "ATPase " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante" partiellement purifiée, ayant une haute activité spécifique. Ces résultats représentent une première étape vers une purification du complexe ATPasique, matériel qui permettrait une analyse beaucoup plus précise des mécanismes mis en jeu lors du transport actif des cations.

:--:--:--:--:--?

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - CIER J.F. - Les facteurs métaboliques et hormonaux de la répartition intra et extracellulaire du sodium et du potassium - J. physiol. (PARIS) 1961, 53-3
- 2 - USSING, H.M. - Transport of ions across cellular membranes - Physiol. Rev. 1949, 29-127
- 3 - CALDWELL, P.C - HODGKIN, A.L. - KEYNES, R.D et SHAW, T.I. - The effect of injecting "energy rich" phosphate compounds on the active transports of ions in the geant axons of loligo. - J. Physiol. (LONDON) 1960, 152-561
- 4 - GARDOS, G. - Akkumulation des Kaliumionen durch menschliche Blutkörperchen. - Acta Physiol. Acad. Sc. Hung. 1954, 6-191
- 5 - WHITTAM, R. et AGER, M.E. - The connexion between active cations transport and metabolites in erythrocytes. - Biochem. J. 1965, 97-214
- 6 - HOFFMAN, J.F. - TOSTESON, D.C. et WHITTAM, R. - Retention of potassium by human erythrocytes ghosts. - Nature 1960, 185-186
- 7 - GLYNN, I.M. - Sodium and potassium movements in human red cells. - J. Physiol. (LONDON) 1956, 134-278
- 8 - HODGKIN, A.L. et KEYNES, R.D. - Active transport of cations in geant axons from sepia and loligo. - J. Physiol. (LONDON) 1955, 128,28
- 9 - BAKER, P.F. - The relationship between phosphorus metabolism and the sodium pump in intact crab nerve. - Biochem. Biophys. Acta 1963, 75, 287
- 10- GILL, T.L. et SOLOMON, A.K. - Effect of ouabaïn on sodium flux in human red cells. - Nature 1959, 193-1127
- 11- TOSTESON, D.G. et HOFFMAN, J.F. - Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. J. Gen. Physiol. 1960, 44, 169

- 12 - SEN, A.K et POST, R.L - Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte - J. Biol. Chem. 1964, 239, 245.
- 13 - GLYNN, I.M - The action of cardiac glucosides on sodium and potassium movements in human red cells - J. Physiol. (London) 1957, 136, 148.
- 14 - WHITTAM, R - The asymmetrical stimulation of a membrane adenosine triphosphatase in relation to active cation transport - Biochem. J. 1962, 84, 110.
- 15 - GARRAHAN, P.J et GLYNN, I.M - The behaviour of the sodium pump in red cells in the absence of external potassium - J. Physiol. (London) 1967, 192, 159.
- 16 - GARRAHAN, P. J et GLYNN, I.M - Exchange ratios for the action pump in red cells during Na : Na and Na : K exchange - J. Physiol. (London) 1966, 185, 31P.
- 17 - SJODIN, R.A - BEAUGE, L.A - J. Gen. Physiol. 1968, 52.
- 18 - LUBOWITZ, H. et WHITTAM R - Ion movements in human red cells independent of the sodium pump - J. Physiol. (London) 1969, 202, 111.
- 19 - KANAZAWA, T - SAITO, M. et TONOMURA, Y - Formation and decomposition of a phosphorylated intermediate in the reaction of Na⁺-K⁺-dependent ATPase - The Journal of Biochemistry 1970, 67, 5, 693.
- 20 - SAITO Masayuki - Kinetics studies on Na⁺-K⁺ dependent ATPase - Annual Report of the Biological Works 1969, 17, 15.
- 21 - POST, R. L - SEN, A.K et ROSENTHAL, S - A phosphorylated intermediate in adenosine triphosphate dependent sodium and potassium transport across kidney membranes - J. Biol. Chem. 1965, 240, 1437.
- 22 - SIEGEL, G.L - KOVAL, G.J et ALBERS, R.W - Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase. VI) Characterisation of the phosphoprotein formed from orthophosphate in the presence of ouabaine - J. Biol. Chem. 1969, 244, 3264.
- 23 - HOKIN, L.E et HOKIN, M.R - Studies on the carrier fonction of phosphatidic acid in sodium transport. I) The turnover of phosphatidic acid and phosphoinositide in the avian salt gland on stimulation of secretion - J. Gen. Physiol. 1960, 44, 61.
- 24 - OPIT, L.J et CHARNOCK, J.S - A molecular model for a sodium pump - Nature 1965, 208, 471.
- 25 - LOWE A.G - Enzyme mechanism for the active transport of sodium and potassium ions in animals cells - Nature 1968, 219, 934.
- 26 - SOLOMON, A.K et GOLD, G.L - Potassium transport in human erythrocytes evidence for a three compartments system - J. Gen. Physiol. 1954, 38, 371

- 27 - HODGKIN, A.L and KATZ, B - The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid - J. Physiol. 1949, 108, 31.
- 28 - GOLDMAN DAVID, E - Potential, impedance, and rectification in membranes - Journal of General Physiology 1943, 27, 37.
- 29 - HARRIS, E.J et BURN, G.P - The transfert of sodium and potassium ions between muscle and the surrounding medium - Transactions of The Farady Society, 1949, 45, 508.
- 30 - HARRIS, E.J et PRANKERD, A.J - The rate of sodium extrusion from human erythrocytes - J. Physiol. 1953, 121, 470.
- 31 - SHA'AFI, R.I et LIEB, W.R - Cation movements in the high sodium erythrocytes of the cat - The Journal of General Physiology, 1967, 50, 1751.
- 32 - SOLOMON, A.K - The permeability of the human erythrocyte to Na^+ and K^+ - J. Gen. Physiol. 1952, 36, 57.
- 33 - GOLD, G.L et SOLOMON A.K - The transport of Na into human erythrocytes "in vivo" - J. Gen. Physiol. 1955, 38, 389.
- 34 - BLOSTEIN, R - Relation between erythrocyte membrane phosphorylation and adenosine-triphosphate hydrolysis - J. Biol. Chem. 1968, 243, 1957.
- 35 - SKOU, J.C et HILBERG, C - The effect of sulfhydryl blocking reagents and of urea on the (Na^+-K^+) activated enzyme system - Biochem. Biophys. Acta, 1965, 110, 359.
- 36 - BAKER, P.F - BLAUSTEIN, M.P - HODGKIN, A.L et STEINHARDT, R. A - The influence of calcium on sodium efflux in squid axons - J. Physiol. (London) 1969, 200, 481.
- 37 - DODGE, J.T - MITCHELL, C et HANAHAN, D.J - The preparations and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes - Archives of Biochemistry and Biophysics, 1963, 100, 119.
- 38 - McELROY, W.D - SELIGER, H.H - WHITE, E.H - Mechanism of bioluminescence, chemiluminescence and enzyme function in the oxidation of firefly luciferin - Photochemistry and photobiology, 1969, 10, 153.
- 39 - SZENT-GYORGYI, A - "Biogenetica" Academic Press, New York, 1957.
- 40 - NODA, L - NIHET, T - MORALES, M.F - J. Biol. Chem. 1954, 208, 613.
- 41 - O'SULLIVAN, W.J - PERRIN, D.D - The stability constant of MgATP^{2-} . Biochem. Biophys. Acta, 1961, 52, 612.

- 42 - SHIZUO WATANABE - TERY TROSPER - MORTON LYNN - LARRY EVENSON - The magnesium binding constants of adenosinetriphosphate and some other compounds estimated by the use of fluorescence of magnesium-8-hydroxyquinoléine - The Journal of Biochemistry, 1963, 54, 1, 17.
- 43 - JALLET, P - LAGET, P - GUERIN, H - PIERI, J - Détermination de la constante d'équilibre du complexe $MgATP^{2-}$ à l'aide du système luciférine-luciférase ; C.R. Acad. Sc. Paris, 1972, 274, 603.
- 44 - PHILIPS, R.C - GEORGE, P - RUTMAN, R.J - Potentiometric studies of the secondary phosphate ionizations of AMP, ADP and ATP and calculations of thermodynamic data for the hydrolysis - Biochemistry, 1963, 2, 3.
- 45 - BELAICH, J.P - SARI, J.S - Microcalorimetric studies on the formation of magnesium complexes of adenine nucleotides - Proceedings of the National Acad. of Sciences of the U.S.A. 1969, 64, (2), 763.
- 46 - BURTON, K - Formation constants for the complexes of adenosine di or triphosphate with magnesium or calcium ions - The Biochemical Journal, 1959, 71, 388.
- 47 - BAKKESEN, J.A et BOUNTING, S.L - Studies on (Na^+-K^+) activated ATPase. XX) Properties of (Na^+-K^+) activated ATPase in rat liver - Biochimica Biophysica Acta, Biomembranes, 1968, 150, 460.
- 48 - WHEELER, K.P et WHITTAM, R - Biochem. J. 1962, 85, 495.
- 49 - SKOU, J.C - Further investigations on a Mg^{2+} - Na^+ activated adenosine triphosphatase, possibly related to the active linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane - Biochemical Biophysica Acta, 1960, 42, 6, 23.
- 50 - SCHONER, W - VON ILBERG, C - KRAMER, R - SEUBER, W - On the mechanism of Na^+ and K^+ stimulated hydrolysis of adenosine triphosphate - European J. Biochemical, 1967, 1, 334.
- 51 - EPSTEIN, F.H - WHITTAM, R - The mode of inhibition by calcium of cell membrane adenosine triphosphatase activity - Biochem. J. 1966, 99, 232.
- 52 - JALLET, P - LAGET, P - GUERIN, H - PIERI, J - Activité ATPasique des membranes des érythrocytes humains : variations des paramètres V_m et K_m en fonction des ions magnésium et calcium - Biochimie, 1971, 53, 615.
- 53 - FAHN, S - KOVAL, G.J - ALBERS, R.W - Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase of electrophorus organ. I) An associated sodium activated transphosphorylation - The Journal of Biological Chemistry, 1966, 241, 8, 1882.

- 54 - WOLF, H.U - ADOLPH, L - Untersuchungen über eine Mg^{2+} - Ca^{2+} - aktivierte ATPase aus Rinderhirnmikrosomen - European J. Biochem. S. 1969, 8, 68.
- 55 - NANNINGA, L.B - The association constant of the complexes of adenosine triphosphate with magnesium, calcium, strontium, and barium ions - Biochem. Biophys. Acta, 1961, 54, 330.
- 56 - MARTELL, A.E - SCHWARZENBACH, G - Adenosinphosphate und Triphosphat cels Komplexbildner für Calcium und Magnesium - Helvetica Chemica, Acta, 1956, 39, 653.
- 57 - WHEELER, K.P et WHITTAM, R - Biochem. J. 1964, 93, 349.
- 58 - SCHATZMANN, H.J - Experimentia, 1966, 22, 364.
- 59 - DUNHAM, E.T et GLYNN, I.M - Adenosine triphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions - J. Physiol. 1961, 156, 274.
- 60 - WINS, P et SCHOFFENIELS, E - Studies on red cell ghost ATPase systems : properties of a (Mg^{2+} - Ca^{2+}) dependent ATPase - Biochem. Biophys. Acta, 1966, 120, 341.
- 61 - VINCENZI et SCHATZMANN - Some properties of Ca^{2+} -activated ATPase in human red cell membranes - Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta, 1967, 25(2), 233.
- 62 - SKOU, J.C - Enzymatic basis for active transport of Na^{+} and K^{+} across cell membrane - Physiol. Rev. 1965, 45, 596.
- 63 - LAGET, P - JALLET, P - GUERIN, H - PIERI, J - Mode d'action du sodium sur la phosphorylation de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante" des membranes des érythrocytes humains.;
- C.R. Acad. Sc. Paris, 1971, 273, 982.
- 64 - LAGET, P - Etude cinétique de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante" des membranes des érythrocytes humains - Thèse de Sciences, 1972, (à paraître).
- 65 - LAGET, P - JALLET, P - GUERIN, H - PIERI, J - Etude du comportement cinétique de l'ATPase " Mg^{2+} - Na^{+} - K^{+} dépendante" des membranes des érythrocytes humains en fonction des ions sodium et potassium- Biochimie, 1972, (à l'impression).
- 66 - BLOSTEIN, R - Sodium activated adenosine triphosphatase activity of the erythrocyte membrane - The Journal of Biological Chemistry, 1970, 245 (2), 270.
- 67 - GARRAHAN, P.J - GLYNN, I.M - The incorporation of inorganic phosphate into adenosine triphosphate by reversal of the sodium pump - The Journal of Physiology, 1967, 192, 237.
- 68 - KUME, S and POST, R.L - Federation Proc. 1969, 6, 1150.

- 69 - ROBINSON, J.D - Kinetic studies on a brain microsomal adenosine triphosphatase. Evidence suggesting conformational changes - Biochemistry, 1967, 5, 3250.
- 70 - SQUIRES, R.F - On the interactions of Na^+ , K^+ , Mg^{2+} and ATP with the Na^+ plus K^+ activated ATPase from rat brain - Biochem. Biophys. Res. Commun. 1965, 19, 1, 27.
- 71 - WHITTAM, R et WHEELER, K.P - Annual Review of Physiology, 1970, 33, 21.
- 72 - McFARLAND, B.H - INESI, G - Solubilization of sarcoplasmic reticulum with Triton X100 - Archives of Biochemistry and Biophysics, 1971, 145, 456.
- 73 - MEDZIHRADSKY, F - KLINE, M.H - HOKIN, L.E - Studies on the characterization of the sodium potassium transport adenosine triphosphatase - Archives of Biochemistry and Biophysics, 1967; 121, 311.
- 74 - DUNHAM, P.P et HOFFMAN, J.F - Partial purification of the ouabain binding component and of Na,K-ATPase from human red cell membranes - Proceedings of the National Academy of Sciences, 1970, 66, 3, 936.
- 75 - PHILIPPOT, J - Reconstitution de l'activité de l'ATPase de transport après solubilisation par le Desoxycholate de sodium. Rôle des ions Na^+ et K^+ dans la structure du complexe lipoprotéique enzymatique - Bulletin de la Société de Chimie Biologique, 1968, 50, 9, 1481.
- 76 - JORGENSEN, P.L et SKOU, J.C - Purification and characterization of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney - Biochimica Biophysica Acta, Biomembranes, 1971, 233, 2.
- 77 - CHAN, R.C - ROSENBLUM, M.S - Effect of sulfhydryl group modification on erythrocyte membrane adenosine triphosphatase - Proceed. of Society for Exp. Biology and Medecin, 1960, 130 (1), 143.
- 78 - MAYER, M and AVI-DOR, Y - Interaction of solvents with membranal and soluble potassium ion-dependent enzymes - Biochem. J. 1970, 116, 49.
- 79 - LOWRY, H.O - ROSEBROUGH, N.J - FARR, L.A - RANDALL, R.J - Protein measurement with the folin phenol reagent - Journal Biological Chemical, 1951, 193, 265.

